

Universidade Federal de Minas Gerais  
Escola de Veterinária  
Colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal

Marco Túlio Gomes Campos

**Desenvolvimento de vacinas inativadas contra a Língua Azul e a Doença Epizoótica Hemorrágica para cervídeos: ensaios pré-clínicos.**

Belo Horizonte - MG  
Escola de Veterinária da UFMG  
2020

Universidade Federal de Minas Gerais  
Escola de Veterinária  
Colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal

Marco Túlio Gomes Campos

**Desenvolvimento de vacinas inativadas contra a Língua Azul e a Doença Epizoótica Hemorrágica para cervídeos: ensaios pré-clínicos.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup> Dra. Zélia Inês Portela Lobato

**Co-orientadores:**

Dra. Ana Carolina Diniz Matos

Prof<sup>ª</sup> Dra. Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes

Belo Horizonte - MG  
Escola de Veterinária da UFMG  
2020

C198d Campos, Marco Túlio Gomes. 1993 -  
Desenvolvimento de vacinas inativadas contra a Língua Azul e a Doença Epizoótica hemorrágica para cervídeos: ensaios pré-clínicos. / Marco Túlio Gomes Campos, 2020.  
71 f:il.

Orientadora: Zélia Inês Portela Lobato

Coorientadoras: Ana Carolina Diniz Matos

Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes

Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais  
Área de concentração: Ciência Animal.

Inclui bibliografia.

- 1- Cervídeo – Doenças -Teses - 2 - Vírus da língua azul- Teses - 3 – Doenças transmissíveis em animais – Teses – I – Matos, Ana Carolina Diniz, II – Guedes, Maria Isabel Maldonado Coelho, III – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – IV – Título.

CDD – 636.089 69

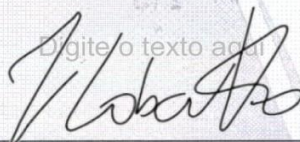
Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

## FOLHA DE APROVAÇÃO

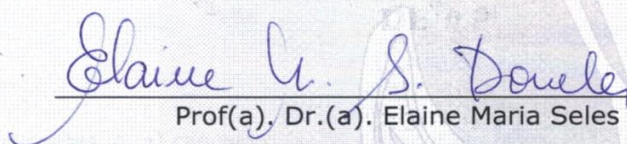
**MARCO TÚLIO GOMES CAMPOS**

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina Veterinária Preventiva.

Aprovado(a) em 31 de janeiro de 2020, pela banca constituída pelos membros:

Digitado texto aqui  


Prof(a). Dr(a). Zélia Inês Portela Lobato  
Presidente - Orientador(a)



Prof(a). Dr.(a). Elaine Maria Seles Dorneles



Prof(a). Dr.(a). Francisco Carlos Faria Lobato



Dedico este trabalho ao meu querido sobrinho, Marco Raphael Saltoris Campos, que em 2018 nasceu para enriquecer nossas vidas com alegria e amor.

*“Sofra o que tiver que sofrer, desfrute o que existe para ser desfrutado, considere tanto o sofrimento como a alegria como fatos da vida e continue orando, não importando o que acontecer, e então experimentará a grande alegria da Lei.” - Nitiren Daishonin.*

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Fabiola de Oliveira Paes Leme, por ter me indicado o Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal (LPVA) para a realização do meu mestrado. Sem essa indicação eu não teria a oportunidade de trabalhar e aprender com essa grande equipe;

À querida equipe do LPVA, que me ensinou a ter paciência e persistência. Nesses dois anos aprendi e extraí um pouco das mais nobres virtudes de cada um, as quais destaco abaixo:

- A pró-atividade da Grazielle Cossenzo, a gentileza e educação da Profa. Maria Isabel Guedes, a alegria da Profa. Érica Azevedo, a serenidade da Fábica Campos, a inteligência da Ana Carolina Diniz Matos e a sabedoria da Profa. Zélia Lobato;

Agradeço, em especial, à Profa. Zélia Inês Portela Lobato, minha orientadora, por todo apoio e paciência com meus momentos de ansiedade e à minha co-orientadora Ana Carolina Diniz Matos pela excelente orientação e ajuda na realização de cada etapa deste trabalho;

À Grazielle Cossenzo por todos auxílios, orientações e “puxões de orelha” que muito me ensinou e me deixou mais forte;

Às Profas. Maria Isabel Guedes e Érica Azevedo Costa por todas ajudas, ensinamentos e soluções de problemas. Também agradeço à Profa. Érica o aceite em participar como membro suplente na defesa da dissertação;

À Fábica Campos pela companhia na rotina do laboratório e pelos deliciosos almoços no ICB;

À Izabelle Rehfeld pela ajuda nas coletas de sangue e pelo aceite em participar como membro suplente na defesa da dissertação;

Aos colegas de pós-graduação Alessandra Alevato, Ana Fraiha, Andreia Cursino e Luis Fonseca pelo apoio emocional e por compartilharem momentos de alegria e tristeza na rotina laboratorial;

À residente pós-doutoral Beatriz Santos pelo fornecimento de insumos utilizados na experimentação animal;

Aos alunos de iniciação científica, Eduardo Caixeta, Maria Vitória, Stella Oliveira, Brenda Monique, Tayná Alves, Lívia Braga, Luísa Franklin, Keith Lohaine, Bárbara Longo e Nágila Rocha pelos momentos de descontração na rotina do laboratório;

À minha “irmã acadêmica”, Mariana Andrioli Pinheiro, e minha amiga de pós-graduação, Aila Solimar, por todos os momentos de descontração e por todas as ajudas relacionadas à vida pessoal e profissional. A amizade de vocês foi essencial para a realização do meu mestrado;

À Mariana Andrioli, muito além da amizade, agradeço também pela valiosa ajuda na realização dos experimentos, pelas caronas e pelos deliciosos lanches da tarde;

Aos professores Francisco Lobato e Elaine Dorneles pelo aceite em participarem como membros titulares da banca e pela contribuição para o crescimento desse trabalho;

À Profa. Marília Martins Melo pelo empréstimo do material para experimentação animal.

Ao CPNq pela bolsa de estudos e por viabilizar financeiramente a realização do experimento.

A todos que não foram aqui mencionados, mas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

### **Agradecimentos especiais**

Agradeço à Deus, que sempre esteve presente em minha vida, especialmente nos momentos de dificuldade, me dando forças e lucidez para contornar os caminhos mais obscuros e sombrios;

À minha namorada, Flávia Prata Linhares, que sempre me apoiou e incentivou a eu continuar buscando a superação dos meus limites, mesmo com a presença de grandes obstáculos no caminho;

Às coelhas que participaram como modelos experimentais neste experimento. Com sua genuína pureza, dedicaram suas vidas para o fornecimento de dados tão valiosos que serão usados para a proteção de espécies de cervídeos;

Ao meu beagle, Snoopy, que sempre esteve ao meu lado no decurso da pós-graduação, me alegrando nos momentos de tristeza e acalmado nos momentos de medo. Em 06/09/2019, enquanto eu concluía a última etapa do meu mestrado, ele partiu dessa vida, deixando marcado em minha memória os bons momentos durante 12 anos de convivência;

Aos meus pais, Cláudia Costa Gomes e Antônio Carlos Campos, por todo amor, incentivo e apoio nessa caminhada da vida acadêmica;

À minha segunda mãe, madrinha e amiga, Maria José de Sousa Santos, por sempre ser luz e fonte de sabedoria em minha vida. Obrigado por tudo, querida madrinha;

Aos meus avós Maria Terezinha Costa Gomes e João Batista Gomes por sempre me tratarem com muito amor e carinho;

Ao meu “pai belo-horizontino”, João Pereira Xavier Chumbinho, por todo apoio e amizade durante minha estada em Belo Horizonte;

À minha amiga Heloísa de Paula Pedroza, que durante esses dois anos, me ajudou na construção do meu currículo acadêmico;

Aos meus amigos de pensionato Daniel Oliveira, Leonardo Rocha, Letícia Cota, Lara Cota, Sidmar Meurer, Sara Evelin Quintero, João Marcelo Chumbinho, Antônio Catunda e Andrés Torres agradeço por todos os momentos de descontração, “palhaçadas” e amizade. Que continuemos com nossas saídas, nossos churrascos e com as “palhaçadas” nos próximos anos.

Embora eu não possa citar todas as pessoas especiais que estiveram ao meu lado nessa jornada, espero alcançá-las, deixando minha eterna gratidão por todo auxílio durante meus dois anos belo horizontinos.

## RESUMO

A língua azul e a doença epizootica hemorrágica são viroses caracterizadas pela ocorrência de distúrbios hemorrágicos em cervídeos e são responsáveis por impactos negativos na conservação dessas espécies. Essas doenças apresentam como agentes etiológicos os vírus BTV e EHDV, respectivamente. A vacinação é o método mais eficaz de controle e prevenção dessas viroses, entretanto, no Brasil, vacinas contra o BTV e o EHDV não são licenciadas pelos órgãos competentes e não há vacinas disponíveis para cervídeos no mercado nacional e exterior. Em razão do exposto, o principal objetivo dessa pesquisa foi o desenvolvimento de vacinas e a realização de ensaios pré-clínicos com formulações vacinais contendo amostras de BTV-3, BTV-14, BTV-18, BTV-19, BTV-22, BTV-24, EHDV-1 e EHDV-2 isoladas na reserva biológica da Itaipu Binacional. As suspensões virais obtidas em laboratório foram inativadas pela beta-propiolactona, adjuvadas de 10% de hidróxido de alumínio e 40% de saponina e distribuídas em duas vacinas distintas: vacina 1 (sorotipos BTV-3, BTV-14, BTV-18 e BTV-19) e vacina 2 (sorotipos BTV-22, BTV-24, EHDV-1 e EHDV-2). Em seguida, testes de inativação viral, esterilidade, inocuidade e potência foram realizados. O teste de inativação viral confirmou a inativação completa dos vírus, enquanto o teste de esterilidade demonstrou a ausência de crescimento bacteriano. O teste de inocuidade, realizado em quatro coelhos, não evidenciou nenhum efeito adverso à vacinação. Para a realização do teste de potência, foram utilizados 15 coelhos distribuídos equitativamente em três grupos experimentais. Os animais foram vacinados isoladamente (G1 – Vacina 1; G2 – Vacina 2) e associadamente (G3 – Vacinas 1+2) com três doses, administradas aos 0, 21 e 51 dias de experimentação. As mensurações de anticorpos totais e anticorpos neutralizantes do teste de potência foram realizadas, respectivamente, por meio de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), utilizando as amostras coletadas aos 81 dias de experimentação, e soroneutralização em microplaca, utilizando as amostras coletadas aos 0, 21, 51 e 81 dias de experimentação. Os resultados do IDGA indicaram a presença de anticorpos totais em 100% dos animais testados para BTV, demonstrando que os antígenos foram capazes de induzir resposta imune humoral. Não foram realizados testes de IDGA para o EHDV. Já no teste de soroneutralização, as medianas obtidas indicaram ausência de anticorpos neutralizantes para o EHDV e presença de anticorpos neutralizantes para o vírus BTV-18 (na vacinação isolada), e BTV-18, BTV-19 e BTV-24 (na vacinação associada) nas amostras coletadas no 81º dia de experimentação. Foi possível observar que as formulações desenvolvidas não foram capazes de induzir resposta de anticorpos neutralizantes para todos os sorotipos e que a vacinação associada promoveu melhor resposta imune humoral. Nossos resultados permitirão o desenvolvimento de novas pesquisas para a formulação de vacinas para cervídeos brasileiros.

Palavras-chave: Síndromes hemorrágicas; BTV; EHDV; Vacinação; Resposta imune.



## ABSTRACT

Bluetongue and epizootic hemorrhagic are viruses' diseases characterized by the occurrence of hemorrhagic disorders in deer and are responsible for negative impacts on these species' conservation. These diseases have BTV and EHDV viruses, respectively, as their etiologic agents. Vaccination is the most effective method of controlling and preventing these viruses. However, in Brazil, vaccines against BTV and EHDV are not licensed by regulatory organizations and there are no vaccines available for deer in national or foreign markets. In view of the above, the main objective of this research was the development of vaccines and the performance of pre-clinical trials with vaccine formulations containing samples of BTV-3, BTV-14, BTV-18, BTV-19, BTV-22, BTV -24, EHDV-1 and EHDV-2 isolated in the biological reserve of Itaipu Binacional. The viral suspensions obtained in the laboratory were inactivated by beta-propiolactone, adjuvanted with 10% aluminum hydroxide and 40% saponin and distributed in two different vaccines: vaccine 1 (serotypes BTV-3, BTV-14, BTV-18 and BTV -19) and vaccine 2 (serotypes BTV-22, BTV-24, EHDV-1 and EHDV-2). Then, viral inactivation, sterility, inoculation, and potency tests were performed. The viral inactivation test confirmed complete virus inactivation, while the sterility test demonstrated the absence of bacterial growth. The inoculation test, carried out on four rabbits, did not show any adverse effects to vaccination. To perform the potency test, 15 rabbits were equally distributed in three experimental groups. The animals were vaccinated separately (G1 - Vaccine 1; G2 - Vaccine 2) and in combination (G3 - Vaccines 1 + 2) with three doses, administered at 0, 21 and 51 days of experimentation. The measurements of total antibodies and neutralizing antibodies of the potency test were carried out, respectively, by means of agar gel immunodiffusion (AGID), using the samples collected after 81 days of experimentation, and soroneutralization in microplate, using the samples collected at 0, 21, 51 and 81 days of experimentation. The results of the AGID indicated the presence of total antibodies in 100% of the animals tested for BTV, demonstrating that the antigens were able to induce humoral immune response. No AGID tests were performed for EHDV. In the soroneutralization test, the medians obtained indicated the absence of neutralizing antibodies for EHDV and the presence of neutralizing antibodies for BTV-18 virus (in the isolated vaccination), and BTV-18, BTV-19 and BTV-24 viruses (in the associated vaccination) in samples collected on the 81st day of experimentation. It was possible to observe that the formulations developed were not able to induce neutralizing antibody response for all serotypes and that the associated vaccination promoted a better humoral immune response. Our results will allow the development of new research for the formulation of vaccines for Brazilian deer.

Keywords: Hemorrhagic syndromes; BTV; EHDV; Vaccination; Immune response.

---

## LISTA DE FIGURAS

---

- Figura 1.** Partícula viral completa e secção transversal dos vírus BTV e EHDV. Adaptado de Alfieri et al (2017) e Roy (2017). ..... **19**
- Figura 2.** Prevalência sorológica da LA e da DEH em ruminantes domésticos no Brasil e na América do Sul. A intensidade de soropositividade é indicada por diferentes tonalidades de azul, conforme demonstrado na barra do canto inferior direito da figura. Fonte: Lobato et al., (2015) **21**
- Figura 3.** Isolamentos de BTV e EHDV realizados durante os anos de 1984 e 2015 na América do Sul, segundo o estudo de revisão realizado por Lobato et al. (2015). ..... **22**
- Figura 4.** Qualidades desejáveis de vacinas contra o BTV e EHDV. Fonte: Adaptado de Rijn (2019). ..... **26**
- Figura 5.** Esquematização da proteção cruzada in vitro dos sorotipos virais (números) do Vírus da Língua Azul. Os traços sólidos em negrito indicam alta proteção cruzada, enquanto os traços sólidos indicam proteção cruzada moderada e os traços pontilhados indicam baixa proteção cruzada. Fonte: Revisto por Rijn (2019). ..... **37**
- Figura 6.** Representação esquemática dos estudos epidemiológicos realizados para a pesquisa de anticorpos contra o BTV e EHDV, além do primeiro isolamento de EHDV-2, realizados em cervídeos no Brasil. .... **38**
- Figura 7.** Histórico clínico-epidemiológico das infecções por BTV e EHDV no CASIB, localizado na Reserva Biológica Bela Vista da Itaipú Binacional durante os anos de 2015, 2016 e 2017. .... **39**
- Figura 8.** Relação filogenética e de neutralização entre os sorotipos de BTV. A neutralização cruzada entre os sorotipos de BTV é indicada por linhas: os traços vermelhos indicam forte proteção cruzada, enquanto os verdes indicam moderada reação e os pontilhados fraca reação. Em azul, estão representados os sorotipos de BTV adicionados na vacina 1, enquanto os sorotipos de BTV e EHDV adicionados na vacina 2 encontram-se destacados em verde. .... **43**
- Figura 9.** Representação esquemática das infecções em monocamadas de células BHK-21 realizadas para avaliação da inativação viral pela  $\beta$ -propiolactona. .... **44**
- Figura 10.** Representação esquemática das vacinações e coletas de sangue realizadas nos coelhos. Foram administradas três vacinas nos dias 0, 21 e 51, enquanto as coletas de sangue foram realizadas nos dias 0, 21, 51 e 81 dias de experimentação. .... **45**
- Figura 11.** Resultados dos testes de inocuidade realizado em quatro coelhos da raça Nova Zelândia. A “figura 11a” apresenta as médias de temperatura corporal (pontos) e o erro padrão da média (traços) das análises realizadas durante sete dias. A área hachurada representa os valores de normalidade para coelhos. A “figura 11b” apresentam as médias de espessura de pele (triângulos) e as amplitudes mínima e máxima (traços) obtidas. Legenda: M0 = Momento 0 (pré-vacinação). .... **49**
- Figura 12.** Mediana do título de anticorpos neutralizantes, expressos em  $\text{Log}_2$ , no momento pré-vacinação e após as três vacinações isoladas e associadas. Legenda: M0 = Momento 0 (Primovacinação); M1 = Momento 1 (21 dias); M2 = Momento 2 (51 dias); M3 = Momento 3 (81 dias). .... **51**

**Figura 13.** Resultados dos testes de soroneutralização em microplaca dos grupos vacinados com uma vacina quadrivalente isolada e vacinados com as duas vacinas quadrivalente associadas. Os resultados individuais de cada animal estão representados pelos pontos e foram transformados para  $\text{Log}_2$ . Os números representam a identificação individual dos animais. Os traços indicam a mediana do título de anticorpos. Legenda: Pré-vac = pré-vacinação; NR – Não realizado. .... **53**

---

## LISTA DE TABELAS

---

- Tabela 1.** Média de anticorpos obtidos por soroneutralização, expressas em  $\text{Log}_2$ , de ovinos e caprinos vacinados com uma formulação polivalente de BTV. .... **29**
- Tabela 2.** Resultados dos testes de ELISA e SN, expressos pela recíproca da maior diluição reagente para anticorpos totais (ELISA) ou para neutralização de 50% do efeito citopático em monocamada de células VERO (SN) dos ensaios pré-clínicos realizados por Lobato (1997). .... **35**
- Tabela 3.** Resultados dos testes de ELISA e SN, expressos pela recíproca da maior diluição reagente para anticorpos totais (ELISA) ou para neutralização de 50% de efeito citopático em monocamada de células VERO (SN) dos ensaios clínicos realizados por Lobato (1997). .... **35**
- Tabela 4.** Títulos virais, expressos em  $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ , diluição do inóculo e multiplicidade de infecção da quarta e quinta infecção realizada em células BHK-21. .... **47**
- Tabela 5.** Título final estimado dos oito sorotipos utilizados como antígenos vacinais após os processos de sonicação, clarificação e adição do tampão  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Item 4.8). .... **47**
- Tabela 6.** Volumes de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  adicionados nas suspensões virais inativadas para neutralização do pH. .... **48**
- Tabela 7.** Fatores de diluição dos oito sorotipos virais para a formulação das vacinas inativas. **49**
- Tabela 8.** Relação de animais positivos, segundo o ponto de corte (diluição 1:4), nos grupos V1, V2 e V1+V2 obtidos 30 dias após a última vacinação. .... **55**
- Tabela 9.** Relação de animais positivos no teste de soroneutralização (resultados expressos em  $\text{Log}_2$ ), segundo o ponto de corte (diluição 1:4), e no teste de imunodifusão em gel de ágar após 30 dias da última vacinação nos grupos V1, V2 e V1+V2. .... **55**

---

## LISTA DE QUADROS

---

- Quadro 1.** Características e funções das proteínas estruturais e não estruturais codificadas pelo genoma do BTV e EHDV. .... **19**
- Quadro 2.** Relação de vacinas inativadas comerciais e experimentais contra a língua azul em estudos de imunogenicidade e eficácia realizados por diversos autores. .... **31**
- Quadro 3.** Relação dos vírus e adjuvantes presentes nas duas vacinas produzidas que ocuparam 50% do volume da vacina em 1 mL de formulação vacinal. .... **43**

---

## SUMÁRIO

---

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
2.1. Objetivos gerais.....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
3.1. Vírus da língua azul e doença epizootica hemorrágica .....	17
3.1.1. Importância em Medicina Veterinária.....	17
3.1.2. Classificação taxonômica .....	18
3.1.3. Características estruturais e de multiplicação viral .....	18
3.1.4. Aspectos epidemiológicos.....	20
3.1.5. Patogênese e sinais clínicos.....	23
3.1.6. Diagnóstico.....	24
3.1.7. Tratamento .....	25
3.1.8. Controle e profilaxia.....	25
3.2. Vacinas .....	26
3.2.1 Vacinas para BTV .....	29
3.2.2. Vacinas para EHDV .....	34
3.2.3. Vacinas de terceira geração.....	34
3.3. Resposta imune contra o BTV e EHDV.....	36
3.4. Doenças hemorrágicas em cervídeos no brasil e a situação do CASIB na usina hidrelétrica de Itaipú .....	37
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>40</b>
4.1. Aspectos éticos.....	40
4.2. Modelo experimental.....	40
4.3. Amostras virais utilizadas nas vacinas .....	40
4.4. Células de mamíferos .....	40
4.5. Produção das suspensões virais.....	41
4.6. Titulação Viral .....	41
4.7. Clarificação .....	42
4.8. Inativação Viral .....	42
4.9. Preparo das formulações vacinais .....	42
4.10. Teste de esterilidade .....	44
4.11. Teste de inativação viral.....	44

4.12. Teste de inocuidade .....	45
4.13. Testes de potência .....	45
4.14. Soroneutralização em microplaca .....	46
4.15. Imunodifusão em gel de ágar .....	46
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
5.1. Preparo das formulações vacinais .....	46
5.2. Testes de inativação viral e esterilidade .....	49
5.3. Testes de inocuidade .....	49
5.4. Soroneutralização em microplaca .....	50
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>62</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>62</b>
<b>ANEXO 1. ....</b>	<b>70</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta dimensões continentais e, em virtude dessa vasta amplitude territorial, abriga vários biomas. Esses biomas são constituídos pela Amazônia, Caatinga, Mata Atlântica, Pampa, Pantanal e Cerrado. Cada bioma apresenta aspectos climáticos e geográficos distintos, além de fauna e flora singulares e específicas. A associação desses biomas e a diversidade animal e vegetal contempla ao território brasileiro a maior biodiversidade do planeta (Brasil, 2019).

Aliado ao título de detentor da maior biodiversidade, o Brasil também apresenta a maior diversidade de cervídeos do mundo, totalizando oito espécies atualmente catalogadas (Duarte et al., 2012). Segundo Barbanti e Reis (2012), os representantes da família *Cervidae* no Brasil incluem o veado-roxo (*Mazama nemorivaga*), o veado-catingueiro (*Mazama guazobira*), o veado-mateiro (*Mazama americana*), o veado-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*), o veado campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*), o cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*), o veado-mão-curta (*Mazama nana*) e o veado-mateiro-pequeno (*Mazama bororo*). As quatro últimas espécies citadas estão listadas como maiores riscos de extinção no Brasil (Barbanti e Reis, 2012; IUCN, 2018).

A língua azul (LA) e a doença epizootica hemorrágica (DEH) são duas doenças que apresentam como agente etiológico dois vírus da família *Reoviridae*, gênero *Orbivirus*, conhecidos como Vírus da Língua Azul (BTV) e Vírus da Doença Hemorrágica Epizootica (EHDV). Esses vírus podem infectar ruminantes domésticos (principalmente ovinos e bovinos) e ruminantes silvestres, entres os quais estão incluídos os membros da família *Cervidae* (Lobato et al., 2015). Atualmente são descritos 27 sorotipos de BTV e sete sorotipos de EHDV (Rijn, 2019). Essas doenças são arboviroses e a transmissão ocorre predominantemente por meio de vetores biológicos, sendo os mosquitos do gênero *Culicoides* os responsáveis pela transmissão entre os animais (Wilson et al., 2009; Lobato et al., 2015).

Em cervídeos, essas doenças hemorrágicas são caracterizadas por disfunções do sistema circulatório, culminando em alterações na homeostase, e são responsáveis por altos índices de morbidade e mortalidade nas espécies acometidas. Os principais agentes etiológicos que ocasionam síndromes hemorrágicas em cervídeos incluem adenovírus e os vírus BTV e EHDV (Baldini, 2018; Kawanami, 2018). Evidências sorológicas e moleculares observadas em diversos estudos no Brasil demonstram que o BTV e EHDV infectam várias espécies de cervídeos no Brasil (Pandolfi, 1999; Montassier et al., 2001; Kawanami, 2016; Favero et al., 2013; Baldini et al., 2018; Kawanami et al., 2018).

Existem evidências científicas desde 1990 que corroboram com a ocorrência de infecções sugestivas de BTV e/ou EHDV em cervídeos da reserva biológica de Itaipu (Barbanti e Reis, 2012; Duarte et al., 2012). Essa reserva biológica, localizada no Estado do Paraná, mantém no lado brasileiro o criadouro de animais silvestres (CASIB), que objetiva a reprodução de espécies ameaçadas de extinção. Em cervídeos que foram a óbito de 1995 a 2016, relatórios de necropsia descreveram achados patológicos compatíveis com doença hemorrágica nos animais do CASIB (Baldini et al., 2018). No período de 2015 a 2017 foi possível isolar os vírus BTV e EHDV desta população, dos quais, após sequenciamento, identificou-se seis sorotipos do BTV (i.e. BTV-3, 14, 18, 19, 22 e 24) e dois sorotipos do EHDV (i.e. EHDV-1 e 2) (Baldini et al., 2018).



Além dos achados de múltiplos sorotipos dos vírus BTV e EHDV circulantes no CASIB, foi observada alta sensibilidade das espécies acometidas, com apresentação clínica de caráter hiperagudo, e altos índices de mortalidade. A ocorrência das doenças apresentou característica sazonal, sendo a mortalidade dos animais registradas no final do verão (março) ao final do outono (junho).

A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) propõe como uma das medidas de controle para o LA e DEH a proteção dos animais aos ataques de *Culicoides* spp, seja pelo uso de inseticidas ou do uso de instalações com barreiras físicas que impeça o contato dos mosquitos com os animais. Apesar dessa recomendação, o controle de vetores em áreas endêmicas é difícil, devido às altas densidades populacionais desses mosquitos que estão correlacionadas com as características climáticas de alta temperatura e umidade. Nesse contexto, o único método que seria efetivo para controle dessas arboviroses em cervídeos é o uso de vacinas (OIE, 2018).

A utilização de vacinas tem reduzido, em grande parte, a morbidade e mortalidade e consequentes perdas econômicas relacionadas as orbivirose em animais de produção (MacLachlan et al., 2015), entretanto, no Brasil, a vacinação contra a língua azul não é permitida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Além disso, no mercado brasileiro e no exterior não existem vacinas contra BTV e EHDV formuladas com os sorotipos específicos que infectam cervídeos no país e pouco se sabe a respeito dos sorotipos circulantes no Brasil, portanto, o uso de vacinas autógenas torna-se uma maneira de controlar as infecções por meio da vacinação.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos gerais**

Formular e avaliar duas vacinas quadrivalentes adjuvadas com hidróxido de alumínio e saponina contendo diferentes sorotipos dos vírus BTV e EHDV para vacinação de cervídeos.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Formular vacinas autógenas inativadas contra o BTV e EHDV para imunização de cervídeos do CASIB – Itaipú Binacional;
- Avaliar a segurança e a resposta imune de duas formulações vacinais em coelhos em dois métodos de aplicação: vacinas administradas separadamente e concomitantemente;
- Avaliar a resposta imune desenvolvida para cada sorotipo presente na vacina por meio de testes de soroneutralização em células VERO e imunodifusão em gel de ágar.

## **3. REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.1. Vírus da língua azul e doença epizoótica hemorrágica**

#### **3.1.1. Importância em Medicina Veterinária**

As doenças hemorrágicas virais são enfermidades infecciosas, mundialmente distribuídas, que apresentam múltiplos agentes etiológicos e se caracterizam por quadros hemorrágicos de rápida evolução associados à altos índices de morbidade e mortalidade (MacLachlan et al., 2015).

Em virtude da infecção em ruminantes domésticos e silvestres, essas doenças são importantes em Medicina Veterinária por apresentarem impactos econômicos e ambientais. A importância global, principalmente da LA, está relacionada a perdas diretas na produção animal, restrições no trânsito de animais e comercialização de produtos e subprodutos de origem animal (Rushton e Lyons., 2016). Os ruminantes silvestres, especialmente os cervídeos, são altamente susceptíveis a estes dois vírus que causam alta mortalidade, sendo, portanto, de grande importância na conservação destas espécies (Baldini et al., 2018).

Essas doenças se destacam pela presença na lista de doenças de notificação obrigatória pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2020) e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2013).

### 3.1.2. Classificação taxonômica

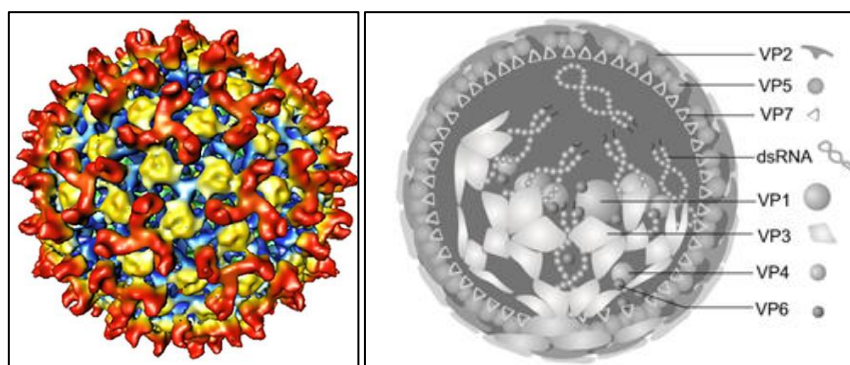
A família Reoviridae é composta por microrganismos capazes de infectar hospedeiros vertebrados, invertebrados, plantas e alguns fungos. Ela é subdividida em duas subfamílias - Sedoreovirinae e Spinareovirinae - as quais apresentam seis e nove gêneros, respectivamente. Esse complexo apresenta vírus que podem infectar os sistemas respiratório e digestório de hospedeiros vertebrados. Ela também abriga alguns vírus que não foram alocados em outras famílias em virtude de particularidades morfológicas, moleculares e/ou infecciosas (Alfieri et al., 2017; ICTV, 2019).

Os vírus BTV e EHDV estão classificados na subfamília Sedoreovirinae e gênero *Orbivirus*. Esta subfamília também engloba outro gênero de importância em Medicina Veterinária – o gênero *Rotavirus* (ICTV, 2019).

### 3.1.3. Características estruturais e de multiplicação viral

Os vírions do BTV e EHDV compartilham várias características em comum (Figura 1). Apresentam partículas não envelopadas, RNA fita dupla com genoma aproximado de 19.200 pares de bases, material genético segmentado (i.e. 10 segmentos) e capsídeo composto por uma a três camadas de proteínas, o que lhes conferem simetria icosaédrica (Roy, 2017).

O genoma do BTV e EHDV codifica 10 proteínas, sendo sete proteínas estruturais (VP1 a VP7) e três proteínas não-estruturais (NS1 a NS3). A camada interna do nucleocapsídeo contém cinco proteínas (VP1, VP3, VP4, VP6 e VP7), enquanto no subnúcleo estão presentes as proteínas VP1, VP4 e VP6. O capsídeo é circundado pela camada externa composta pelas proteínas VP2 e VP5, sendo essas proteínas as principais responsáveis pelo determinante do sorotipo e estímulo para a produção de anticorpos neutralizantes (Alfieri et al., 2017; Roy, 2017). As funções das outras proteínas encontram-se descritas no quadro 1.



**Figura 1.** Partícula viral completa e secção transversal dos vírus BTM e EHDV. Adaptado de Alfieri et al (2017) e Roy (2017).

**Quadro 1.** Características e funções das proteínas estruturais e não estruturais codificadas pelo genoma do BTM e EHDV.

Proteína	Localização	Principais funções
VP1	Núcleo interno	RNA Polimerase
VP2	Capsídeo externo	Adsorção; Hemaglutinação; Determinação do sorotipo
VP3	Subnúcleo	Sustentação da VP7
VP4	Núcleo interno	Função enzimática de guanililtransferase e metiltransferase
VP5	Capsídeo externo	Penetração viral
VP6	Núcleo interno	Ligação à ssRNA, dsRNA, helicase e ATPase
VP7	Subnúcleo	Determinação do sorogrupo
NS1	Não-estrutural	Formação dos túbulos
NS2	Não-estrutural	Formação de corpúsculos de inclusão e ligação de RNA de fita simples
NS3	Não-estrutural	Auxílio no egresso das partículas víricas

**Fonte:** Adaptado de Alfieri et al (2017).

Atualmente são reconhecidos 27 sorotipos do BTM e sete sorotipos do EHDV (Rijn, 2019).

Os sorotipos BTM-25, 26 e 27 são descritos como atípicos, porque são encontrados exclusivamente em pequenos ruminantes, não são patogênicos e a transmissão ocorre por contato direto (Rijn, 2019). Em relação ao EHDV, além dos sete sorotipos, é conhecida a existência do sorotipo EHDV-2 atípico, também chamado de Ibaraki vírus, que pode causar doença clínica grave em bovinos (MacLachlan e Guthrie, 2010).

Nesses orbivirus, em virtude da natureza do RNA segmentado, podem ocorrer rearranjos entre diferentes vírus durante coinfeções nas mesmas células, seja com o envolvimento de diferentes sorotipos ou não. Esse fenômeno pode gerar a longo prazo a emergência de novos sorotipos e

juntamente com eventos de mutação, são responsáveis pela diversidade genética de múltiplos sorotipos diferentes entre o BTV e EHDV (Alfieri, et. al. 2017).

#### 3.1.4. Aspectos epidemiológicos

A LA e a DEH são doenças transmitidas por mosquitos do gênero *Culicoides* spp., popularmente conhecidos como mosquito-pólvora (Chagas e Pinheiro, 2003; Lobato et al., 2015).

Mais de 1.400 espécies de *Culicoides* spp. são descritas, das quais 20 espécies estão vinculadas a epidemiologia das orbivirose (Chagas e Pinheiro, 2003), sendo o *Culicoides insignis* a principal espécie responsável pela transmissão dessas orbivirose na América do Sul (Lobato et al., 2015; Aybar et al., 2016).

Por se tratar de transmissão vetorial, a epidemiologia dessas enfermidades está ligada diretamente às características ambientais, já que estas influenciam a densidade populacional dos vetores (Mayo et al., 2014). A distribuição dessas doenças e dos vetores biológicos no mundo ocorre aproximadamente entre latitudes 50° N e 35° S, incluindo regiões tropicais, subtropicais e temperadas do globo (Coetzee et al. 2012).

Os principais fatores ambientais que contribuem para a ocorrência dos vetores biológicos são a umidade e temperatura. Assim, as zonas de ocorrência dessas doenças são classificadas, segundo Lobato et al. (2015) e Ruder (2015), em zonas epidêmicas, endêmicas e de transição:

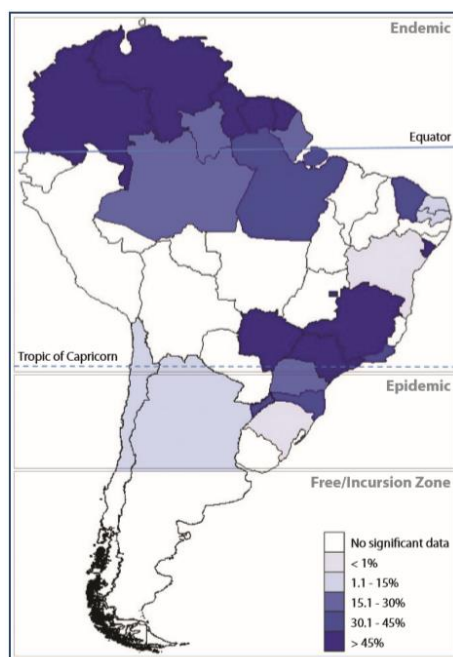
- i. As zonas endêmicas são localizadas em regiões de clima tropical e são caracterizadas pela atividade dos vetores biológicos e transmissão do vírus durante todo o ano;
- ii. As zonas epidêmicas são localizadas em regiões de clima subtropical e temperado e a atividade dos vetores biológicos apresentam característica de sazonalidade, ou seja, estão restritas a períodos de maior temperatura e umidade (i.e. verão).
- iii. Zonas livres são áreas de não ocorrência da doença em virtude de condições climáticas que impedem a proliferação dos vetores biológicos e a doença pode ocorrer caso ocorra mudanças ambientais que permitam a proliferação dos vetores biológicos.

A ocorrência da doença clínica dessas arbovirose no Brasil é mais frequente na região Sul, por apresentar clima subtropical e ser uma área epidêmica. Nessa região, a frequência de animais positivos é baixa, como mostra o estudo de Costa (1999), no qual a prevalência de anticorpos observada em 1.341 amostras de sangue coletadas em ovinos foi de 0,15%. Nesses animais a primo-infecção pode ocorrer em filhotes não protegidos com anticorpos maternos e na vida adulta, resultando em doença clínica.

Já nas regiões endêmicas, os hospedeiros são infectados ainda jovens e geralmente conseguem controlar a viremia por meio dos anticorpos maternos adquiridos durante a ingestão do colostro, resultando em infecções subclínicas. Os animais gestantes, que já tiveram contato com os vírus e que estão constantemente sendo desafiados com os sorotipos virais que circulam na região, mantem níveis protetores de anticorpos circulantes que são destinados à prole durante a

amamentação (Vitour, 2011; Speiser et al., 2016). Além disso, a baixa ocorrência de sinais clínicos em zonas endêmicas também pode estar associada a subnotificação dessas doenças, visto que os sinais clínicos são inespecíficos e comuns a outras doenças (Lobato et al., 2015).

No Brasil, o primeiro relato da presença do BTV foi realizado em 1975 por diagnóstico sorológico (citado por Grocock e Campbell, 1982) e nos últimos anos, diversos trabalhos epidemiológicos demonstram a presença do BTV e do EHDV distribuídos em todo território nacional, conforme demonstrado pela Figura 2.



**Figura 2.** Prevalência sorológica da LA e da DEH em ruminantes domésticos no Brasil e na América do Sul. A intensidade de soropositividade é indicada por diferentes tonalidades de azul, conforme demonstrado na barra do canto inferior direito da figura. **Fonte:** Lobato et al., (2015).

O isolamento dos vírus de BTV e EHDV também foi demonstrado em vários estudos conduzidos em território nacional, conforme descrito na revisão de Lobato et al. (2015).

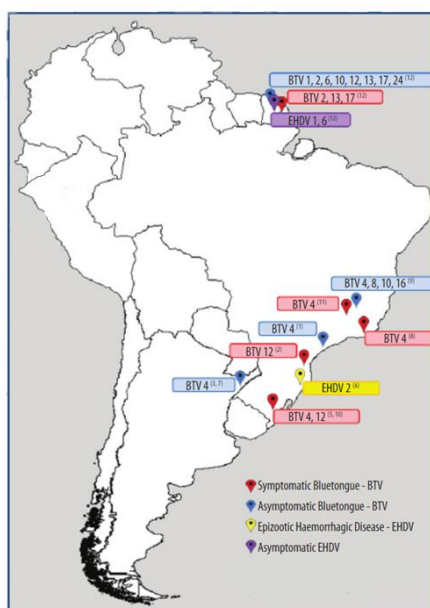
- i. Em 2001, na cidade de Curitiba – Paraná, vinte e uma ovelhas e uma cabra apresentavam sinais clínicos compatíveis com a doença, que foi confirmada por diagnóstico laboratorial. Neste surto, o sorotipo envolvido foi o BTV-12 (Clavijo et al., 2002). Um ano após, foi registrado outro surto no mesmo Estado, com o envolvimento de 29 ovelhas e 13 cabras, com índices de mortalidade iguais a 62% e 69%, respectivamente. Não houve a identificação do sorotipo envolvido (Lager, 2004).
- ii. Em 2009, o sorotipo BTV-12 foi isolado e identificado em dois surtos ocorridos no Rio Grande do Sul, com o envolvimento de ovelhas (Antoniassi et al., 2010). Já em 2013, foi relatado outro surto da LA em uma propriedade rural destinada à ovinocultura leiteira em Vassouras – Rio de Janeiro, onde o sorotipo BTV-14 foi isolado e identificado (dados não publicados). Outro surto de língua azul identificado

no Brasil aconteceu em 2014, em cinco cidades do Rio Grande do Sul. Nesse relato, o BTV-4 foi identificado como o sorotipo responsável pela infecção de ovinos nas cinco propriedades rurais envolvidas (Guimarães et al. Dados não publicados);

- iii. Em cervídeos, a infecção pelo vírus da língua azul foi relatada na reserva biológica Bela Vista, localizada na usina hidrelétrica Itaipú Binacional, onde foi possível identificar o envolvimento dos sorotipos BTV-3, BTV-14, BTV-18, BTV-19 e BTV-22 em infecções envolvendo animais das espécies *Mazama nana*, *M. guazoubira*, *M. americana* e *Blastocerus dichotomus* (Baldini et al., 2018).

Em relação ao EHDV, o primeiro relato da ocorrência de doença clínica em cervídeos foi registrado em um zoológico no Estado de Santa Catarina, onde um cervídeo da espécie *Mazama gouazoubira* morreu cinco dias após apresentar sinais clínicos típicos da doença e outro animal da espécie *Mazama nana* apresentou doença clínica de caráter hiperagudo e morreu. Nesse relato, a confirmação do vírus foi realizada pela reação em cadeia da polimerase em tempo real utilizando transcriptase reversa (RT-qPCR) e imunoperoxidase, entretanto, não houve tipificação do sorotipo envolvido (Favero et al., 2013).

Além dos sorotipos BTV-4, BTV-12 e BTV-14 e do vírus EHDV identificados nos surtos supracitados, há evidências da circulação dos sorotipos BTV-1, BTV-3, BTV-4, BTV-8, BTV-10, BTV-12, BTV-16, BTV-17, BTV-18, BTV-19, BTV-22, BTV-24, EHDV-1 e EHDV-2 em diversos estudos realizados em território nacional (Lobato et al., 2015; Guimarães, 2017; Baldini et al., 2018). A Figura 3 demonstra alguns dos isolamentos realizados em território nacional.



**Figura 3.** Isolamentos de BTV e EHDV realizados durante os anos de 1984 e 2015 na América do Sul, segundo o estudo de revisão realizado por Lobato et al. (2015).

Apesar do registro dos múltiplos sorotipos de BTV e EHDV no país, o conhecimento sobre os sorotipos circulantes é insuficiente para a compreensão da cadeia epidemiológica sobre essas doenças em diferentes localidades, o que dificulta a elaboração de vacinas protetoras, uma vez que a proteção é sorotipo específica (Lobato et al., 2015). Devido ao grande número de sorotipos

circulantes, geralmente é impossível prever o sorotipo para uma estação ou área específica em situações de risco epidemiológico e, além disso, vários sorotipos tendem a circular simultaneamente (Dungu, 2004; Baldini et al., 2018).

Até o momento, o que os dados permitem concluir é que essas arboviroses estão disseminadas em todo o território nacional em virtude da elevada prevalência sorológica em animais domésticos e silvestres, mas os sorotipos existentes no país e sua distribuição ainda são pouco conhecidos (Lobato et al., 2015).

Assim como na África e no Brasil, a erradicação do vírus da língua azul (BTV) em regiões endêmicas é praticamente impossível devido ao papel desempenhado pelos *Culicoides* spp. que estão amplamente distribuídos e em função da presença de várias espécies de hospedeiros que podem atuar como reservatórios (Dungu, 2004).

### 3.1.5. Patogênese e sinais clínicos

As doenças resultantes da infecção pelo BTV e EHDV são caracterizadas pela apresentação de quadros clínicos com envolvimento do sistema circulatório, resultando em distúrbios hemorrágicos (MacLachlan e Gard, 2009). O mecanismo fisiopatogênico envolvido nessas alterações está relacionado ao tropismo celular destes vírus. Eles infectam células endoteliais dos vasos sanguíneos, resultando em morte celular e conseqüentemente distúrbios circulatórios, hemostáticos primários e secundários nos animais infectados (Belbis et al., 2017).

Após inoculação pela picada dos vetores biológicos, os vírus infectam leucócitos agranulócitos (i.e., linfócitos, monócitos e macrófagos) no sítio de entrada e células dendríticas nos linfonodos regionais. Esse processo pode durar, em média, de dois a três dias (Belbis et al., 2017; Roy, 2017).

Posteriormente, em um processo que pode durar de quatro a 20 dias, as partículas virais são disseminadas pelo organismo, alcançando órgãos linfoides secundários – principalmente baço e outros linfonodos – e órgãos altamente vascularizados, como os pulmões, onde infectam as células endoteliais dos vasos sanguíneos, monócitos e macrófagos, completando o segundo pico de viremia. Após isso, as novas partículas virais podem se disseminar pelo organismo por meio da linfa e do sangue (Belbis, 2017; Roy, 2017).

A disseminação pelo organismo pode ocorrer pelos monócitos infectados e por hemácias e plaquetas. Em virtude disso, vários sistemas orgânicos são acometidos, resultando em síndromes de caráter sistêmico. Durante a disseminação das partículas virais esses vírus também podem se associar com as hemácias, pela interação das partículas virais com glicoforinas (proteínas de superfície celulares) em um mecanismo de invaginação da membrana plasmática, o que favorece a evasão da resposta imune e a persistência da viremia por mais ou menos 100 dias (Schwartz-Cornil et al., 2008).

A infecção pode resultar em morte celular por apoptose ou necrose. As células infectadas podem produzir mediadores inflamatórios como prostaglandina F<sub>2</sub>-alfa e tromboxano. Esses mediadores inflamatórios são importantes na vasodilatação e agregação plaquetária, respectivamente, resultando em síndrome hemorrágica, trombozes e edema quando produzidos em excesso (DeMaula et al., 2001). Além disso, as lesões celulares podem resultar na exposição do colágeno subendotelial, estimulando a atividade pró-coagulante pela via intrínseca da cascata da

coagulação, contribuindo para a ocorrência de coagulação intravascular disseminada (CID) e formação de trombos (MacLachlan e Gard, 2009).

Os sinais clínicos dessas arboviroses são semelhantes, inespecíficos e a gravidade das doenças podem variar de acordo com a espécie animal envolvida, com as características intrínsecas do hospedeiro e com o sorotipo viral envolvido. Fatores ambientais, como a variação climática, também contribuem na ocorrência da doença clínica (Belbis, 2017).

Essas doenças podem se apresentar com aspecto clínico de assintomático (na grande maioria dos animais infectados em regiões endêmicas) a fatal, principalmente em ovelhas, cabras, cervídeos e alguns ruminantes selvagens (OIE, 2018).

Os ovinos são mais susceptíveis que bovinos e apresentam doença clínica mais agressiva. Especula-se que o mecanismo envolvido na patogenicidade em ovinos seja relacionado à produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias pelas células endoteliais, visto que a replicação do vírus nos pequenos ruminantes é menor que a replicação nos bovinos (DeMaula et al., 2001). Em contrapartida, a doença clínica em bovinos raramente acontece, porém esses animais apresentam maior replicação viral e são importantes fontes de infecção para os vetores biológicos no ambiente (MacLachlan et al., 2015).

Os sinais mais comuns observados incluem prostração, letargia, cianose, febre, sialorreia, ceratoconjuntivite, descarga nasal mucopurulenta com formação de crostas ao redor das narinas, quelite angular ulcerativa, dispneia, hemorragia em pulvino dental, glossite, sialorreia e inflamação em vulva, hiperemia e congestão de mucosas (principalmente em língua, lábios, focinho e pálpebras), edema facial, estomatite acompanhada de ulceração e necrose, laminite, pneumonia, má formação fetal e aborto (OIE, 2018).

Nos cervídeos, a infecção pelo vírus da doença epizootica hemorrágica pode também manifestar-se com quadros hemorrágicos excessivos e fulminantes (incluindo diarreia sanguinolenta e hematuria) que podem acarretar em choque hipovolêmico e morte (Lobato et al., 2015; Bianchi et al., 2017; OIE, 2018).

### 3.1.6. Diagnóstico

O diagnóstico das arboviroses pode ser clínico, mas requer a confirmação por técnicas laboratoriais, visto que alguns quadros são inespecíficos (Kawanami, 2018). Além disso, o diagnóstico laboratorial torna-se importante no rastreamento dos animais assintomáticos e daqueles que sofrem infecções subclínicas (Wilson et al., 2015).

Os principais meios de diagnóstico preconizados pela OIE (2018) incluem métodos diretos e indiretos:

- i. Os métodos diretos são realizados por isolamento viral em hospedeiros susceptíveis, ovos embrionados ou cultivos celulares e testes moleculares, os quais incluem a reação em cadeia da polimerase utilizando transcriptase reversa, reação em cadeia da polimerase em tempo real [usando primers específicos para o gene do segmento 10 e 9, respectivamente, que codificam proteínas conservadas desses vírus (Oru et al., 2006; Maan et al., 2016 a,b)], dot blot, hibridização in-situ e por microscopia eletrônica. O último método permite a visualização dos agentes etiológicos, mas



quase nunca são utilizadas em virtude da disponibilidade destes equipamentos e pelo custo da técnica;

- ii. Os métodos indiretos são realizados para a pesquisa de anticorpos contra proteínas virais estruturais e não estruturais. As principais técnicas para diagnóstico de grupo específico incluem a imunodifusão em géis de ágar (IDGA), ensaios imunoenzimáticos (ELISA), reações de imunofluorescência, enquanto para o diagnóstico de sorotipos específicos realiza-se testes de soroneutralização, ensaios de redução e inibição em placas ou inibição de fluorescência.

Como diagnóstico diferencial para LA e DEH a OIE (2018) recomenda que seja realizada a investigação para as seguintes doenças: ectima contagioso, febre aftosa, estomatite vesicular, febre catarral maligna, diarreia viral bovina, rinotraqueíte viral bovina, infecção por parainfluenza do tipo 3, varíola ovina, fotossensibilização, pneumonia, poliartrites e abscessos, fotosensibilização e doença epizootica hemorrágica.

### 3.1.7. Tratamento

Não existem tratamentos específicos para nenhuma das enfermidades (OIE, 2018). Em casos de doença clínica, o tratamento é de suporte, sendo realizado o uso de antiinflamatórios não esteroidais, fluidoterapia para reposição do volume plasmático que sofre alterações nos quadros hemorrágicos e antibioticoterapia para o tratamento de infecções bacterianas secundárias (Bianchi et al., 2017).

Em virtude da inexistência de tratamento específico, métodos de controle e profilaxia são primordiais para a prevenção da infecção, da ocorrência clínica da doença ou diminuição da transmissão por vetores.

### 3.1.8. Controle e profilaxia

Os métodos clássicos de controle dos vírus BTV e EHDV indicados na literatura são as restrições de movimentação animal ou eliminação dos animais infectados, entretanto, em áreas endêmicas esses métodos dificilmente são possíveis, devido a persistência dos vetores biológicos e dos vírus (associados a infecções assintomáticas) na população animal e o grande número de animais infectados (OIE, 2018).

Segundo a OIE (2018), para áreas endêmicas, os melhores métodos de controle incluem: monitoramento da presença do vírus por meio de animais sentinelas; identificação, vigilância e rastreamento de animais potencialmente infectados; implementação de quarentena em sistemas produtivos; restrição de movimento de animais durante o período de atividade de insetos; controle dos vetores biológicos e vacinação dos animais susceptíveis, sendo essa o método mais eficaz para o controle dessas doenças.

As estratégias de vacinação variam entre diferentes países e são influenciadas por políticas públicas e pela distribuição geográfica dos sorotipos dos vírus BTV e EHDV (Bhanuprakash, 2009). No Brasil, não existem vacinas comerciais disponíveis e o uso de vacinas importadas não é permitido (Lobão, 2014). Nesse contexto, o uso de vacinas autógenas seria única solução para imunização de hospedeiros susceptíveis no país.

No tocante dos tipos de vacinas disponíveis, as vacinas de primeira geração (i.e. antígenos completos atenuados ou inativados) estão licenciadas comercialmente em diversos países (McVey e MacLachlan, 2015). Já as vacinas de segunda e terceira geração ainda estão restritas à pesquisa científica e incluem antígenos recombinantes, vacinas vetorizadas e proteínas químicas (Bhanuprakash, 2009, Rijn, 2019).

### 3.2. Vacinas

Para um bom controle dessas enfermidades, é esperado que uma vacina seja eficaz, segura, acessível e que preferencialmente diferencie animais infectados e vacinados DIVA (*Differentiating Infected from Vaccinated Animals*). A Figura 4 resume os pontos desejáveis de uma vacina contra o BTV, segundo Rijn (2019).



**Figura 4.** Qualidades desejáveis de vacinas contra o BTV e EHDV. **Fonte:** Adaptado de Rijn (2019).

Embora a Figura 4 expresse os requisitos ideais de uma vacina, dificilmente é possível obter todas essas vantagens em um único produto. Em virtude disso, preza-se pela eficácia que está relacionada à proteção contra a infecção, bloqueio da transmissão dos vírus em animais infectados para os vetores e/ou diminuição dos sinais clínicos. Também é desejável que uma vacina induza resposta imunológica celular e humoral duradoura (Bhanuprakash, 2009; McVey e MacLachlan, 2015; Rijn, 2019).

A primeira vacina para o BTV foi produzida na África do Sul em 1940 e utilizou como antígeno vacinal o sorotipo 15 atenuado. De 1940 para os dias de hoje, diversas vacinas comerciais e experimentais contra LA e DEH foram produzidas e estão disponíveis, entretanto, produtos licenciados para venda são mais limitados e estão restritos a certas partes do mundo (Bhanuprakash, 2009).

Vacinas atenuadas são obtidas a partir da modificação do perfil de virulência das partículas virais por meio de passagens sucessivas em cultivos celulares ou ovos embrionados. Esse processo seleciona vírus com maior aptidão para crescer *in vitro*, mas que possuem uma capacidade reduzida para se replicar *in vivo* e causar doenças (Savini et al., 2004).

O uso de vacinas atenuadas tem como vantagens o custo mais acessível e melhor eficácia. Elas desenvolvem uma boa resposta imune celular associada a uma resposta imune humoral

satisfatória. Além disso, a memória imunológica desse tipo de vacina é mais duradoura e permite o desenvolvimento de uma resposta imune heteróloga, pois a resposta mediada por linfócitos T contra proteínas não estruturais que são expressas em grande quantidade quando o vírus está em processo de replicação pode favorecer à proteção cruzada contra diferentes sorotipos (Savini et al., 2004; Bhanuprakash, 2009, Speiser et al., 2016).

As vacinas atenuadas são produzidas e usadas há muitos anos na África do Sul. A *Onderstepoort Biological Products* é a indústria responsável pela produção de vacina polivalentes atenuadas na África, contendo cerca de 15 sorotipos administrados em três imunizações pentavalentes individualmente (cinco sorotipos por imunização). A imunidade a todos os sorotipos é incompleta quando administrada concomitantemente (Dungu et al., 2004).

Vacinas similares são produzidas e usadas desde a década de 1950 também nos Estados Unidos, onde a única vacina aprovada para uso nacional é contra o sorotipo 10 atenuado (Rijn, 2019). Vacinas atenuadas contra BTV-10, BTV-11 e BTV-17 também são produzidas e seu uso está limitado a ovelhas, na Califórnia.

Como desvantagem, o uso de vacinas atenuadas está relacionado ao risco de reversão de virulência, redução da produção de leite em ovelhas lactantes, presença de sinais clínicos de doença, aborto, morte embrionária precoce e teratogênese quando usadas fêmeas gestantes, particularmente na primeira metade da gestação e rearranjo de fragmentos genéticos das amostras vacinais com os dos vírus selvagens, já que esses vírus possuem a capacidade de trocar segmentos do material genético quando estão co-infectando a mesma célula. Esse fenômeno também pode ocorrer entre amostras de campo (Baldini et al., 2018). Como exemplo da reversão de virulência ou pobre atenuação, o uso vacinas atenuadas, produzidas na década de 50, nos Estados Unidos, foi retirada do mercado cerca de 20 anos depois, porque foi observado a capacidade do vírus atravessar a placenta e infectar o feto, induzindo efeitos teratogênicos fatais (McVey e MacLachlan, 2015).

Em 2003, na Itália, 17 rebanhos bovinos sentinelas positivos para língua azul foram investigados quanto às características do vírus responsável pela infecção, sendo o sorotipo BTV-2 identificado. Os pesquisadores também avaliaram 57 pools de *Culicoides* para a pesquisa do BTV-2. Houve confirmação da presença do BTV-2 nos vetores biológicos, o que foi associado aos antígenos vacinais de uma vacina atenuada que havia sido aplicada nos rebanhos da região. O antígeno da vacina também foi detectado em áreas não incluídas na campanha de vacinação (Ferrari et al., 2005). Além da transmissão vetorial, em um estudo retrospectivo realizado por Savini et al. (2014), foram isolados de tecidos fetais os sorotipos BTV-2 e BTV-9, provenientes de vacinas, confirmando a infecção vertical dos fetos oriundos de fêmeas vacinadas.

A partir dessas suspeitas, vários casos de retirada de vacinas atenuadas do mercado foram registrados, como para alguns lotes específicos na África do Sul, onde uma vacina atenuada foi retirada do mercado em virtude da possível reversão de virulência e recombinação dos seus segmentos genéticos com amostras de campo, possíveis efeitos abortigênicos e transmissão dos antígenos vacinais por vetores biológicos competentes (MacVey e MacLachlan, 2015).

Apesar dos efeitos adversos das vacinas atenuadas, seu uso ainda é realizado para alguns sorotipos em algumas partes do mundo, como nos Estados Unidos, Turquia, África do Sul, Índia, Israel e partes da Europa. Entretanto, hoje, o número de vacinas atenuadas disponíveis comercialmente é inferior ao número de vacinas inativadas (MacVey e MacLachlan, 2015).

Como alternativa ao risco relativo do uso de vacinas atenuadas, a indústria veterinária desenvolveu vacinas inativadas, que apresentam como principal característica a segurança de inoculação nos animais de produção, pois se o processo de inativação foi bem-sucedido, não há riscos de virulência residual e ocorrência da doença clínica no animal imunizado (Rijn, 2019).

Historicamente, as vacinas inativadas foram inicialmente produzidas experimentalmente na década de 70, utilizando como antígeno o BTV-2 (Parker et al., 1975). Posteriormente, foi produzida uma vacina bivalente contendo os sorotipos BTV-2 e BTV-4 na Europa (Savini et al., 2008), assim como para os sorotipos BTV-1, BTV-9 (Zientara et al., 2013) e para o sorotipo virulento BTV-8 (Hamers et al., 2009) que surgiu no norte da Europa em 2006.

Em uma revisão de literatura, MacVey e MacLachlan (2015) citam que em vários estudos de segurança sobre o uso de vacinas inativadas para BTV e EHDV as reações pós-vacinais foram bem toleradas (ausência de reação sistêmica, febre, perda de peso, disfunção reprodutiva), com exceção de raros casos nos quais algumas vacinas induziram reações locais transitórias que desapareciam dentro de três dias.

A quantidade de antígeno por dose de vacina inativada deve, de forma ideal, ser em torno de  $10^7$  TCID<sub>50</sub> (*Tissue culture infective dose*) de vírus, enquanto para as vacinas atenuadas cerca de  $10^5$  TCID<sub>50</sub> (Rijn, 2019). Em virtude disso, o uso de vacinas inativadas tem como desvantagem o maior custo na cadeia produtiva, já que o processo de inativação viral somado à adição de adjuvantes, o aumento da massa antigênica e a necessidade de reforços vacinais para a manutenção da imunidade a níveis protetores, aumentam custo da vacinação (Tizard, 2014; MacVey e MacLachlan et al., 2015).

Sobre o uso de adjuvantes, eles conferem a vantagem de maximizar a eficácia das vacinas, aumentando a resposta pró-inflamatória, velocidade ou magnitude da resposta do sistema imune e, conseqüentemente, a modulação da memória imunológica. Entretanto, reações locais e sistêmicas podem ser observadas após a administração de adjuvantes (Awate, 2013). Além disso, eles podem ser classificados, em relação aos mecanismos de ação, como adjuvantes de depósito, particulados, imunoestimulantes ou combinados (Spickler e Roth, 2003).

Nas vacinas contra a LA e DEH, os adjuvantes mais utilizados incluem o hidróxido de alumínio, responsável pela liberação controlada do antígeno no local da inoculação, prolongando o tempo de exposição dos antígenos para as células do sistema imune (efeito de depósito), associado à saponina, adjuvante que estimula o sistema imunológico pela inibição da tolerância imunológica, aumentando a interação de moléculas coestimulatórias e estímulo seletivo de uma resposta de linfócitos T auxiliares, subtipo 1, e o Montanide ISA 206, adjuvante oleoso com efeito de depósito (Bhanuprakash, 2009).

A eficácia de vacinas inativadas é satisfatória, o que torna seu uso uma boa estratégia para o controle da infecção nos hospedeiros susceptíveis (Hamers et al., 2009). Como exemplo da eficácia e da proteção induzida por essas vacinas em grandes populações de animais, Hamers et al. (2009) e MacVey e MacLachlan (2015), relatam que a introdução do vírus BTV-8 levou ao desenvolvimento de vacina inativada contra esse sorotipo para a vacinação de bovinos e ovinos em grande parte da Europa, resultando em altos índices de proteção. Outros trabalhos que avaliaram a eficácia de vacinas inativadas também foram desenvolvidos.

### 3.2.1 Vacinas para BTV

Savini et al. (2004) avaliaram a cinética de anticorpos de uma vacina atenuada contendo os vírus BTV-2 e BTV-9. As respostas de anticorpos foram avaliadas utilizando duas vacinas monovalentes isoladas contendo o BTV-2 e BTV-9 e uma vacina bivalente contendo os dois sorotipos associados. A pesquisa de anticorpos totais por ELISA detectou anticorpos antes do teste soroneutralização para os dois sorotipos de BTV. Além disso, nos animais testados os maiores títulos de anticorpos foram detectados nas vacinas monovalentes, enquanto vacinas bivalentes resultaram em títulos mais baixos de anticorpos que se desenvolveram mais lentamente.

Speiser et al. (2016) compararam a resposta humoral entre ovelhas vacinadas com uma vacina inativada e uma vacina atenuada contra o vírus BTV-17, com aplicações realizadas aos 0 e 21 dias. Além disso, havia animais gestantes no experimento e avaliou-se a presença de anticorpos em cordeiros aos cinco e dez dias após o nascimento. Todas as ovelhas vacinadas desenvolveram anticorpos anti-BTV aos 14 dias após a vacinação e permaneceram soropositivas por um ano. Todos os cordeiros também apresentaram anticorpos. Os autores concluíram que ambas as vacinas induziram anticorpos contra o BTV-17 que persistiram por pelo menos um ano e forneceram imunidade passiva aos cordeiros.

Já no estudo de Hamers et al. (2009) as propriedades de uma vacina inativada contra o BTV-8 foram avaliadas em ovinos e bovinos, vacinados com duas doses com 28 dias de intervalo. Posteriormente todos os animais desafiados com BTV-8 e os resultados de segurança e eficácia foram obtidos. Os autores concluíram que os animais vacinados foram clinicamente protegidos sem ocorrência de viremia.

Prasad et al. (2018) utilizaram ovinos e caprinos como modelo experimental para a avaliação da imunogenicidade de uma vacina polivalente contendo os sorotipos BTV-1, BTV-2, BTV-10, BTV-16 e BTV-23. Em cada espécie, os animais foram vacinados por via subcutânea com duas doses com intervalo de 28 dias. Os animais foram observados quanto a reações locais ou sistêmicas após a vacinação. As amostras de sangue foram coletadas no 28º e no 60º dia após a primeira e última dose da vacina, respectivamente, para avaliação da resposta de anticorpos neutralizantes por soroneutralização e anticorpos totais por ELISA. Os resultados revelaram que as formulações foram seguras e induziram a produção de anticorpos a partir dos 28 dias nos ovinos e caprinos com respostas heterólogas distintas, as quais encontram-se descritas na tabela 1.

**Tabela 1.** Média de anticorpos obtidos por soroneutralização, expressas em  $\text{Log}_2$ , de ovinos e caprinos vacinados com uma formulação polivalente de BTV.

	<i>Ovinos (n=19)</i>				<i>Caprinos (n=18)</i>		
	0 dias	28 dias	60 dias		0 dias	28 dias	60 dias
<b>Sorotipo</b>				<b>Sorotipo</b>			
<b>BTV-1</b>	2,58	6,63	7,81	<b>BTV-1</b>	3,09	7,41	8,63
<b>BTV-2</b>	3,38	7,56	8,44	<b>BTV-2</b>	3,22	7,81	8,91
<b>BTV-10</b>	3,47	8,83	9,31	<b>BTV-10</b>	2,91	9,16	9,58
<b>BTV-16</b>	3,09	8,93	9,40	<b>BTV-16</b>	2,94	8,03	8,78
<b>BTV-23</b>	3,32	8,61	9,34	<b>BTV-23</b>	2,99	8,56	9,40

**Fonte:** Prasad et al. (2018)

Em cervídeos, Lorca-Oró et al. (2012) avaliaram a eficácia de duas vacinas inativadas comerciais adjuvadas com hidróxido de alumínio e saponina contendo os sorotipos BTV-1 (Syvazul 1) e BTV-8 (Syvazul 8) em animais da espécie *Cervus elaphus* (cervo vermelho). Os animais receberam duas doses com intervalos de 28 dias. Após 42 dias, os animais vacinados foram desafiados com os vírus homólogos e a carga viral foi pesquisada por RT-qPCR. A imunogenicidade das vacinas foi conferida por testes sorológicos de ELISA e soroneutralização.

Os autores observaram que nenhum animal desafiado apresentou sinais clínicos da doença e viremia detectável, além de relatarem a presença de anticorpos por ELISA a partir dos 21 dias após a primeira dose da vacina para os ambos sorotipos e a presença de anticorpos neutralizantes após a primeira vacinação em todos os animais imunizados contra o BTV-1 e em metade dos animais imunizados com BTV-8. Também foi observado que após a segunda dose de vacinação aumentou-se o título de anticorpos, com pico máximo aos 34 dias e todos cervos soroconverteram nos testes de ELISA e soroneutralização.

Em coelhos, no estudo realizado por Macedo (2004), a potência de quatro formulações vacinais contendo o sorotipo BTV-4 inativado pela  $\beta$ -propiolactona e adjuvadas com hidróxido de alumínio, adjuvantes oleosos (emulsão e microemulsão) e um adjuvante comercial (Emulsigen) foram avaliadas. Os coelhos desse experimento foram vacinados com duas doses, intervaladas entre 21 dias com vacinas contendo  $10^{7,1}$  TCID<sub>50</sub>/mL de vírus. A avaliação da soroconversão foi realizada pela técnica de soroneutralização em microplacas com amostras de soro coletadas aos 0, 21, 35 e 60 dias.

Os resultados do teste de potência demonstraram que após 21 dias da vacinação, alguns animais apresentaram soroconversão, entretanto, as medianas de todos os grupos foram iguais a zero. Já no dia 35 e 60 pós-vacinação, todos os grupos apresentaram soroconversão, sendo as menores medianas obtidas para os adjuvantes Emulsão Múltipla, Microemulsão e Hidróxido de Alumínio, enquanto a maior mediana foi resultante para o grupo Emulsigen.

Outros estudos envolvendo vacinas inativadas comerciais e experimentais contra o BTV, realizados nas últimas décadas, foram descritos no quadro 2 para uma melhor descrição da massa antigênica, dos adjuvantes, da via de inoculação utilizadas, e resultados de imunogenicidade e eficácia.

**Quadro 2.** Relação de vacinas inativadas comerciais e experimentais contra a língua azul em estudos de imunogenicidade e eficácia realizados por diversos

Autor	Vírus	Tipo de vacina	Massa antigênica em TCID <sub>50</sub>	Adjuvante	Modelo animal	Número de vacinações/Intervalo	VI	Ac na primeira análise/Intervalo#	Ac na segunda análise /Intervalo#	D/P
Hilke et al. (2019)	BTV-4	C Bluevac® 4 e 8	10 <sup>6,5</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	HA + Saponina	Ovinos	2/4 semanas	SC	1:4 – 1:8 4 semanas	Negativo – 1:56 16 semanas	NR
	BTV-8							Negativo – 1:18 4 semanas	Negativo – 1:4 16 semanas	
	BTV-4	C BTVPur AlSap® 4	10 <sup>7,1-8,5</sup> TCID <sub>50</sub> /mL			Dose única		1:4 – 1:12 4 semanas	Negativo – 1:14 16 semanas	
	BTV-8	C Zulvac® 8	NI					Negativo – 1:20 4 semanas	Negativo – 1:58 16 semanas	
Zhugunissa et al. (2018)	BTV-4 e BTV-16	E	10 <sup>7,50</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	Montanide ISA 71VG	Ovinos	Dose única	IM	1:16 – 1:128 10 dias	NR	+/+
Speiser et al. (2016)	BTV-17	E	NI	NI	Ovinos	2 doses/21 dias	SC	NR	1:80 – 1:640 1 ano	NR
Breard et al. (2015)	BTV-2 e BTV-4	C BTVPur AlSap®	10 <sup>7,1-8,5</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	HA + Saponina	Ovinos	2 doses/21 dias	SC	1:4 – 1:126 42 dias	NR	+/+
	BTV-9		10 <sup>7,1-8,5</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	HA + Saponina		2 doses/21 dias		1:8 (1 animal) 42 dias	NR	
Batten et al. (2013)	BTV-8	C Bovilis® BTV-8	500 unidades antigênicas	HA + Saponina	Bovinos	2 vezes/4 semanas	SC	NR	1:10 – 1:240 4 anos	NR
					Ovinos			NR	1:20 – 1:240 2,5 anos	
Oura et al. (2012)	BTV-8	C Bovilis® BTV-8	500 unidades antigênicas	HA + Saponina	Bovinos	2 vezes/4 semanas	SC	NR	Negativo – 1:320 3 anos	NR

autores.

<b>Autor</b>	<b>Vírus</b>	<b>Tipo de vacina</b>	<b>Massa antigênica em TCID<sub>50</sub></b>	<b>Adjuvante</b>	<b>Modelo animal</b>	<b>Número de vacinações/Intervalo</b>	<b>VI</b>	<b>Ac na primeira análise/Intervalo#</b>	<b>Ac na segunda análise /Intervalo#</b>	<b>D/P</b>
Wäckerlin et al. (2010)	BTV-8	C Bluevac <sup>®</sup> 8	10 <sup>6,5</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	HA + Saponina	Ovinos	Dose única	SC	1:4 – 1:32 28 dias	NR	+/+
		C BTVPur AlSap <sup>®</sup> 8	NI	NI		Dose única		Negativo – 1:4 28 dias	NR	+/+
		C Zulvac <sup>®</sup> 8	NI	HA + Saponina		2 vezes/3 semanas		Negativo – 1:16 28 dias	NR	+/+
Zanolari (2010)	BTV-8	C Bovilis <sup>®</sup> BTV-8	500 unidades antigênicas	HA + Saponina	Alpacas e Lhamas	2 vezes/21 dias	SC	Negativo – 1:32 14 dias	1:10 – 1:200 156 dias	NR
		C BTVPur AlSap <sup>®</sup> 8	NI	HA + Saponina						
Hamers et al. (2009)	BTV-8	E	NI	HA + Saponina	Ovinos	Dose única	SC	1:3 – 1:5 14 dias	1:10 – 1:1000 40 dias	+/+
					Bovinos	2 vezes/28 dias		SC	1:3 14 dias	1:50 – 1:200 43 – 80 dias
Savini et al. (2007)	BTV-16	E	10 <sup>7,7</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	Montanide ISA 206	Ovinos	2 vezes/28 dias	SC	Negativo – 1:80 14 dias	1:64 – 1:187 28 dias	+/+
Emidio (2004)	BTV-2	E	10 <sup>7,8</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	Montanide ISA 206	Ovinos	2 vezes/14 dias	SC	1:20 – 1:275 14 dias	Negativo – 1:136 28 dias	+/+



Autor	Vírus	Tipo de vacina	Massa antigênica em TCID <sub>50</sub>	Adjuvante	Modelo animal	Número de vacinações/Intervalo	VI	Ac na primeira análise/Intervalo#	Ac na segunda análise /Intervalo#	D/P
Macedo (2004)	BTV-4	E	10 <sup>7,10</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	Vírus sem adjuvante	Coelhos	2 vezes/21 dias	SC	Negativo – 1:8 21 dias	1:8 – 1:32 35 dias	NR
				HA + Saponina				Negativo – 1:16 21 dias	Negativo – 1:64 35 dias	
				Emulsão múltipla				Negativo – 1:4 21 dias	Negativo – 1:64 35 dias	
				Microemulsão				Negativo 21 dias	Negativo – 1:16 35 dias	
				Emulsigen				Negativo – 1:256 21 dias	1:8 – 1:32 35 dias	
Parker et al. (1975)	BTV-3	E	10 <sup>5,10</sup> TCID <sub>50</sub> /mL	Dupla emulsão	Ovinos	Dose única	SC	1:20 – 1:60 8 dias	1:40 – 1:480 14 dias	NR
	BTV-4							1:40 – 1:60 8 dias	1:40 – 1:1924 14 dias	
	BTV-3 e BTV-4							<b>BTV-3</b> 1:20 – 1:120 8 dias	<b>BTV-3</b> 1:80 – 1:962 14 dias	
								<b>BTV-4</b> 1:30 – 1:60 8 dias	<b>BTV-4</b> 1:120 – 1:962 14 dias	

**Legenda:** \*Vacina atenuada. #Título de anticorpos neutralizantes obtidos por testes de soroneutralização. C = comercial; E = experimental; HA: Hidróxido de alumínio; NI = Não informado; SC = Subcutânea; IM = Intramuscular; NR= Não realizado; VI = Via de inoculação; D/P = Desafio/Proteção. A presença de cruzes (+) indica que o teste foi o desafio foi realizado e que houve proteção in vivo.

### 3.2.2. Vacinas para EHDV

Em relação às vacinas contra o EHDV, a disponibilidade de vacinas comerciais e experimentais é significativamente inferior à disponibilidade de vacinas para a língua azul. Existem vacinas atenuadas e inativadas comercialmente disponíveis no Japão apenas contra a doença de Ibaraki, causada pelo EHDV-2 atípico (Kitano, 2004 revisado por McVey e MacLachlan, 2015).

Essa disponibilidade é afetada principalmente pelo interesse comercial sobre o uso dessas vacinas, visto que, com exceção do EHDV atípico que pode infectar bovinos, os demais sorotipos do EHDV não infectam animais de produção, mas podem infectar animais silvestres, os quais não apresentam interesse econômico na indústria pecuária, apenas interesse de conservação ambiental (Alfieri et al., 2017).

Vacinas autógenas foram produzidas nos Estados Unidos usando antígenos inativados de EHDV, entretanto, segundo McVey e MacLachlan (2015), os resultados de eficácia apresentados em alguns trabalhos são anedóticos e pouco informativos e não há dados revisados por pares disponíveis na literatura.

Como exemplo da informação supracitada, no trabalho de Wisely e Saylor (2016), a segurança e a eficácia de uma vacina autógena inativada produzida nos Estados Unidos para vacinação de cervos da cauda branca foi estudada. A vacina continha os sorotipos EHDV-1, EHDV-2, EHDV-6 e BTV-17 associados. Os animais foram triados para a presença de anticorpos contra o EHDV-45 dias antes da vacinação e apresentaram resultados negativos. Posteriormente, realizaram-se novas coletas no momento pré-vacinação e 30 dias após a vacinação. Os resultados sorológicos, obtidos após 30 dias da vacinação, não evidenciaram soroconversão para o EHDV. Todos os valores foram iguais ou inferior aos valores basais mensurados antes da vacinação. O método para mensuração dos anticorpos e os adjuvantes utilizados não foram informados pelos autores.

Já Spedicato e colaboradores (2016) avaliaram uma vacina experimental contra o EHDV-2 (Ibaraki vírus) em bovinos. Os autores utilizaram uma vacina contendo  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL aplicada em dose única, via subcutânea, e observaram títulos de anticorpos por soroneutralização correspondendo a 1:100 a 1:10.000 aos 28 dias após a primovacinação. Os anticorpos foram detectados aos 105 dias após a primovacinação, mantendo-se a títulos médios variando de negativo a 1:3.162.

### 3.2.3. Vacinas de terceira geração

As vacinas de terceira geração são fortes candidatos vacinais para a substituição dos produtos licenciados atualmente.

Até o presente momento, não há vacinas de terceira geração licenciadas no mercado internacional. Elas estão restritas à experimentação. A eficácia das vacinas modernas é satisfatória e são produtos seguros, pois com a manipulação laboratorial, não há riscos como discutido nas vacinas atenuadas (McVey e MacLachlan, 2015).

Essas vacinas podem ser de primeira categoria (subunidades), segunda categoria (remoção de genes de interesse) que são importantes vacinas para a diferenciação de animais naturalmente

infectados de animais vacinados, terceira categoria (vacinas vetorizadas) e quarta categoria (vacinas de DNA) (Rijn. 2019).

Lobato (1996) avaliou a resposta imunológica e a proteção induzida contra a língua azul (sorotipo BTV-1) por uma vacina vetorizada com vírus vaccínia em ensaios pré-clínicos, utilizando coelhos, e em ensaios clínicos, utilizando ovelhas. Nesse estudo, o vírus vaccínia foi utilizado como vetor para a expressão de proteínas do cerne (VP7) e capsídeo viral (VP2 e VP5) do BTV-1, individualmente ou em conjunto. Coelhos e ovelhas foram imunizados e a resposta humoral e celular foram estudadas para presença de anticorpos pelos testes de ELISA e soroneutralização. Anticorpos neutralizantes foram detectados principalmente nos animais que receberam os recombinantes expressando VP5 isolada, VP2+VP5 associadas e VP2+VP5+VP7 associadas, com melhor resposta nos animais imunizados com as proteínas associadas. Além disso, ovelhas inoculadas com recombinantes expressando VP2+VP5 foram protegidas contra o desafio com o BTV.

Os resultados da imunogenicidade obtidas em coelhos encontram-se descritos na tabela 2.

**Tabela 2.** Resultados dos testes de ELISA e SN, expressos pela recíproca da maior diluição reagente para anticorpos totais (ELISA) ou para neutralização de 50% do efeito citopático em monocamada de células VERO (SN) dos ensaios pré-clínicos realizados por Lobato (1997).

Teste/Coelho	Grupos					
	VP2	VP5	VP2/VP5	VP2-VP5	VP2-VP5-VP7	
ELISA	1	320	2560	5120	1280	1280
	2	20	10240	160	40960	2560
	3	10	1280	160	<10	5120
SN	1	4	8	4	8	<2
	2	4	32	2	8	4
	3	<2	4*	<2	<2	2

**Legenda:** SN – Soroneutralização; VP – *Viral protein*; \*Vacinado com duas doses.

Os resultados obtidos em ovelhas encontram-se descritos na tabela 3.

**Tabela 3.** Resultados dos testes de ELISA e SN, expressos pela recíproca da maior diluição reagente para anticorpos totais (ELISA) ou para neutralização de 50% de efeito citopático em monocamada de células VERO (SN) dos ensaios clínicos realizados por Lobato (1997).

Grupos	Ovelha	ELISA	SN
VP2	7	40	<4
	10	40	<4
	11	640	4
VP5	6	320	<4
	15	<20	<4
	21	<20	<4
VP2-VP5	2	320	8
	4	160	16
	18	5120	128
NS	3	<20	<4
	22	<20	<4
	23	<20	<4
BTV	12	5120	512
	19	2560	512

---

**Legenda:** SN – Soroneutralização; VP – *Viral protein*; NS – *Non structural protein*.

### 3.3. Resposta imune contra o BTV e EHDV

A imunidade humoral e celular contra o BTV já foram relatadas como mecanismos efetores capazes de proteger ovelhas contra a infecção e o desenvolvimento da doença. A participação da imunidade humoral foi comprovada por estudos que realizaram a transferência de imunidade passiva com anticorpos homólogos a alguns sorotipos, sugerindo um papel *in vivo* de neutralização e proteção, enquanto a participação da imunidade celular já foi demonstrada em modelos experimentais com o envolvimento de linfócitos T efetores CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (Lobato, 1996; Schwartz-Cornil et al., 2008; Bhanuprakash, 2009; Darpel et al., 2009).

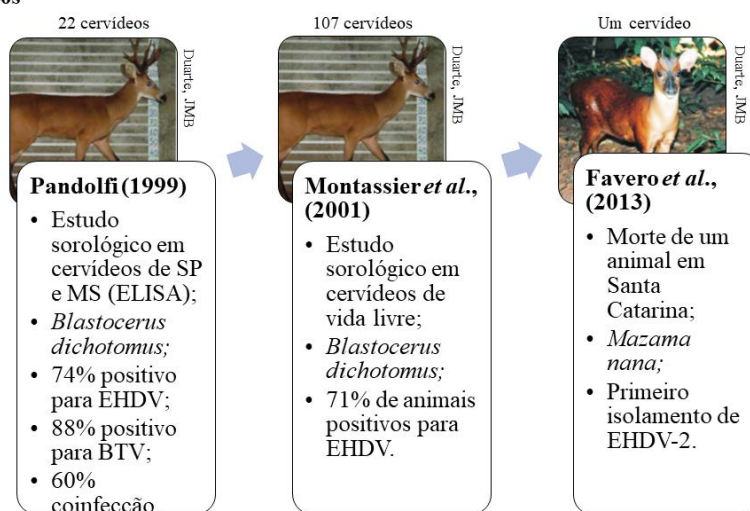
A resposta imune humoral contra os vírus EHDV e BTV está relacionada às proteínas que compõem a partícula viral, incluindo proteínas estruturais e não estruturais. As proteínas VP2 e VP5 são as principais responsáveis pela indução da produção de anticorpos neutralizantes, pois são as proteínas envolvidas na adsorção e penetração da partícula viral nas células. Já as outras proteínas desses vírus são importantes para a produção de outros tipos de anticorpos não neutralizantes (Alfieri et al., 2017). A VP7 é imunodominante e gera anticorpos específicos para grupo e que podem ser utilizados para o diagnóstico e identificação de qualquer tipo e cepa de BTV por ELISA. Embora estes anticorpos não apresentem atividade neutralizantes, são importantes para o diagnóstico e para outros processos da resposta imunológica (Darpel et al., 2009).

Anticorpos neutralizantes produzidos contra um sorotipo de BTV geralmente fornecem proteção somente contra o desafio com cepas de BTV pertencentes ao mesmo sorotipo e não contra cepas de sorotipos heterólogos, ou seja, a imunidade humoral é sorotipo-específica. Entretanto, há evidências *in vivo* de proteção cruzadas entre sorotipos em animais que foram infectados sequencialmente com dois ou mais sorotipos de BTV (Darpel et al., 2009).

Estudos realizados *in vitro* já demonstraram a existência de proteção cruzada em virtude da similaridade antigênica da VP2 e VP5 de alguns sorotipos de BTV (Lobato, 1996; McVey e MacLachlan, 2015; Martinelli et al., 2018). Essa similaridade genética permite o agrupamento de sequências semelhantes em sorogrupos e as respostas imunológicas direcionadas a sorotipos virais específicos podem neutralizar parcialmente outros sorotipos virais dentro do mesmo sorogrupo, conferindo imunidade cruzada, conforme exemplificado na Figura 5 (Rijn, 2019). Em relação ao EHDV, foi observada neutralização entre os sorotipos EHDV-1 e EHDV-2 em microplacas (Dados não publicados).



1990 - Evidência de síndromes hemorrágicas em cervídeos (Duarte *et al.*, 2012)



**Figura 6.** Representação esquemática dos estudos epidemiológicos realizados para a pesquisa de anticorpos contra o BTV e EHDV, além do primeiro isolamento de EHDV-2, realizados em cervídeos no Brasil.

Em um estudo retrospectivo realizado por Kawanami (2018) amostras de tecidos parafinados provenientes de cervídeos de cativeiro e de vida livre necropsiados entre os anos de 1994 e 2011 no setor de Patologia Veterinária da Universidade Estadual Paulista foram selecionados para a pesquisa de vírus responsáveis por doenças hemorrágicas em cervídeos.

De um total de 253 cervídeos necropsiados, entre eles filhotes e adultos, 42 casos apresentavam sinais clínicos e lesões macroscópicas sugestivas de doenças hemorrágicas e foram selecionados para a pesquisa de RNA viral de BTV e EHDV e pesquisa de adenovírus por imuno-histoquímica nos tecidos parafinados. As espécies e o número de animais identificados foram 17 *Blastocerus dichotomus*, 12 *Mazama guazobira*, oito *M. americana*, três *M. nana*, um *M. bororo* e um *M. nemorivaga*.

Os resultados desse estudo revelaram que nenhum animal apresentava RNA viral para o vírus EHDV e nenhum animal apresentava proteínas virais do adenovírus, enquanto 16,6% (7/42) dos animais foram positivos para BTV na reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Apesar dos resultados negativos e do pequeno percentual de animais positivos, a autora comenta que pelo tempo de fixação em formalina as amostras poderiam resultar em resultados negativos em virtude da degradação do material genético.

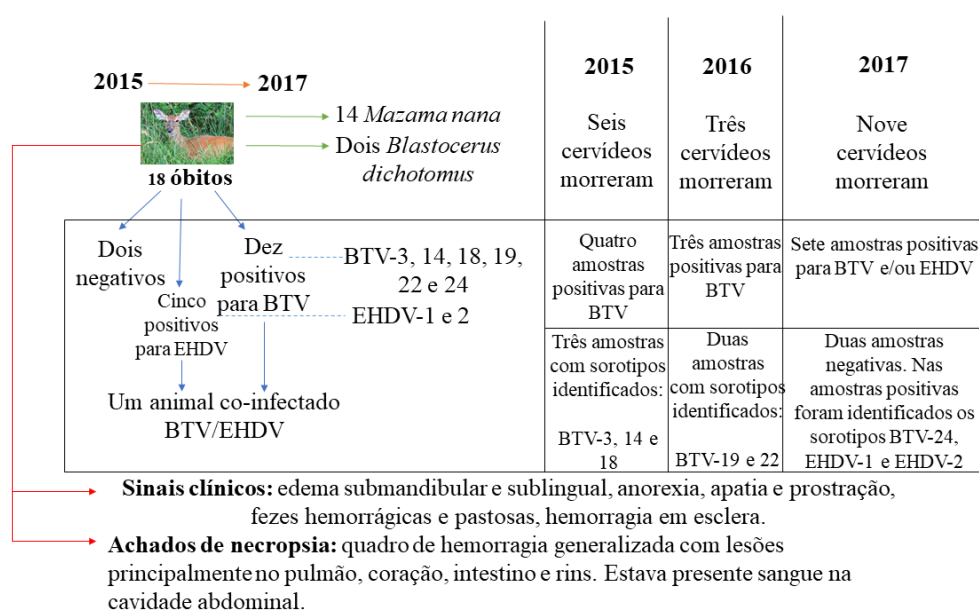
Outro estudo epidemiológico envolvendo cervídeos, realizado por Kawanami (2016), avaliou a presença de anticorpos contra LA pelas técnicas de IDGA e ELISA e a presença de material genético do BTV por RT-PCR em cervídeos no núcleo de pesquisa e conservação de cervídeos. Foram identificados 47,3% de animais positivos para BTV no IDGA, 38,46% positivos no ELISA e quatro animais positivos na RT-PCR.

Já durante os anos de 2015 a 2017, foram relatados surtos de síndromes hemorrágicas com confirmação da infecção pelos vírus BTV e EHDV no refúgio biológico de Itaipú (Baldini *et al.*, 2018) (Figura 7). No tocante dos aspectos clínicos, foram observadas as seguintes características:

- i. Alta sensibilidade das espécies acometidas com curso rápido e alta mortalidade. Amostras de soro coletadas dos animais doentes antes da morte foram testadas para a presença de anticorpos e apresentaram resultado negativo, mostrando um curso hiperagudo;
- ii. Não houve predileção entre os sexos. Em relação à idade dos animais que morreram, os adultos foram os mais frequentemente acometidos, seguido dos jovens;
- iii. As espécies de cervídeos que vieram a óbito por BTV ou EHDV foram *Mazama nana* e *Blastocerus dichotomus*;
- iv. A doença apresentou caráter sazonal, sendo a mortalidade dos animais registrada nos meses de março a junho.

Em relação à identificação dos sorotipos circulantes, foi possível identificar os seguintes agentes:

- i. Sorotipos de BTV-3, 14, 18, 19 e EHDV-1 e 2. Observou-se a co-circulação de vários sorotipos de BTV e EHDV-1 e 2, com predomínio do sorotipo EHDV-1 em 2017, mas nas amostras de 2015 e 2016 não foi constatado o envolvimento de EHDV nos surtos. Os sorotipos de BTV não se repetiram em anos consecutivos;
- ii. Adenovírus foi pesquisado, mas não foi identificado.



**Figura 7.** Histórico clínico-epidemiológico das infecções por BTV e EHDV no CASIB, localizado na Reserva Biológica Bela Vista da Itaipú Binacional durante os anos de 2015, 2016 e 2017.

Até o presente momento, o controle dessas doenças no CASIB está sendo realizado por meio da utilização de coleiras impregnadas com deltametrina e pelo isolamento dos animais em baias teladas para evitar o contato deles com os *Culicoides* spp. durante o período de atividade do mosquito, que ocorre no período crepuscular (comunicação pessoal).

Apesar da efetividade deste isolamento, o método é laborioso e não protege efetivamente os animais contra a LA e a DEH. O uso de vacinas autógenas, isto é, utilizando os mesmos sorotipos circulantes na reserva, torna-se uma estratégia de controle mais precisa e permite uma proteção mais duradoura e eficaz nos cervídeos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Aspectos éticos

O presente projeto foi aprovado pelo CEUA da UFMG sob o número de processo 177/2018 (Anexo 1).

### 4.2. Modelo experimental

Para o estudo pré-clínico foram utilizadas 19 coelhas da raça Nova Zelândia oriundas da Fazenda Experimental Hélio Barbosa - UFMG, com peso entre 1 – 2 kg e idade aproximada de 45 dias. Os animais foram mantidos nas instalações do Laboratório de Produção de Soros e Vacinas da Escola de Veterinária em gaiolas individuais (80 x 45 x 60 cm) com estrado de metal.

A alimentação dos animais consistiu em feno de *Cynodon* spp. ad libitum, fornecimento de aproximadamente 150 gramas de ração peletizada por dia e esporadicamente verduras, legumes e frutas. Os animais também receberam água potável ad libitum.

Os animais permaneceram em período de adaptação durante sete dias.

### 4.3. Amostras virais utilizadas nas vacinas

As amostras utilizadas para a formulação das vacinas autógenas foram obtidas do banco de vírus do Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal da Escola de Veterinária - UFMG. Estes vírus foram previamente isolados de cervídeos brasileiros do refúgio biológico Bela Vista que foram a óbito com sinais clínicos de síndrome hemorrágica.

Amostras de tecidos dos animais acometidos foram processadas e avaliadas para a presença de BTV e EHDV. Posteriormente, as amostras positivas foram isoladas e por sequenciamentos genéticos de segmentos sorotipo-específicos foi caracterizada a presença do BTV-3, BTV-14, BTV-18, BTV-19, BTV-22 (Baldini et al., 2018) e BTV-24, EHDV-1 e EHDV-2 (dados não publicados).

### 4.4. Células de mamíferos

Células BHK-21 (*Baby Hamster Kidney* 21), clone 13, obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC), número de catálogo “CCL-10”, foram utilizadas para multiplicação e titulação viral, enquanto células VERO (*African Green Monkey Kidney*), número de catálogo “CCL-81”, obtidas da ATCC, foram utilizadas para os testes de soroneutralização em microplacas.

As células da linhagem BHK-21 foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 5% de caldo fosfato tryptose, 5% de soro fetal bovino (Gibco) livre de BTV e EDHV, 0,3% de glutamina e 1% de antibióticos (10.000 UI/mL de penicilina/10.000



$\mu\text{g/mL}$  de estreptomicina). Já as células VERO foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM) suplementado com 5% de soro fetal bovino (Gibco), 0,3% de glutamina e 1,5% de antibióticos, sendo 1% de penicilina/estreptomicina e 0,5% de anfotericina B.

#### 4.5. Produção das suspensões virais

Para multiplicação dos vírus, as amostras virais de BTV e EHDV foram inoculadas em monocamadas de células BHK-21 apresentando 90% de confluência celular. Posteriormente, os cultivos celulares infectados foram incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 60 minutos para adsorção dos vírus na monocamada. Ao término desse processo, os cultivos de BHK-21 receberam meio de cultivo DMEM suplementados com 2% de soro fetal bovino, 5% de caldo *tryptose* fosfato e 0,3% de glutamina, e foram incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ .

As células foram mantidas nas condições supracitadas até a observação de 90% de efeito citopático na monocamada. Posteriormente, as suspensões celulares foram armazenadas a  $4^{\circ}\text{C}$ . A obtenção das suspensões virais foi realizada por meio de cinco passagens dos vírus em células BHK-21.

As duas passagens iniciais foram obtidas de sementes do banco de vírus do Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal (LPVA). A terceira passagem foi realizada às cegas com diluição 1:50 das suspensões obtidas das sementes em garrafas de plástico com área de  $25\text{ cm}^2$ . A quarta passagem foi realizada às cegas com diluição 1:50 utilizando as amostras obtidas na terceira passagem em garrafas de plástico com área de  $75\text{ cm}^2$  com volume de meio igual a 15 mL, enquanto a quinta passagem foi realizada com MOI de 0,01 utilizando as amostras obtidas na quarta passagem também em garrafas com área de  $75\text{ cm}^2$  com 15 mL de meio de manutenção. As suspensões virais obtidas na quarta e quinta passagem foram tituladas (Item 4.6).

#### 4.6. Titulação Viral

A quantificação viral foi realizada pelo ensaio de ponto final pelo método de titulação em microplacas de 96 poços, segundo o protocolo descrito pela OIE (2018) com modificações. Para tanto, as sementes de vírus foram homogeneizadas com auxílio de vórtex e foram realizadas diluições seriadas de base dez em meio de cultivo DMEM puro ( $10^{-1}$  até  $10^{-10}$ ). Cinquenta microlitros de cada diluição foram adicionados nas colunas das microplacas, correspondendo, portanto, oito repetições para cada diluição. Duas colunas foram preenchidas com meio de cultivo DMEM sem vírus para o controle de células. Posteriormente foram adicionados por poço 50  $\mu\text{L}$  contendo aproximadamente  $10^4$  células BHK-21 tripsinizadas e ressuspendidas em meio DMEM suplementado com 4% de soro fetal bovino, 5% de caldo *tryptose* fosfato, 0,6% de glutamina e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina).

O mesmo procedimento foi realizado para a titulação em células VERO, com exceção do meio de cultivo, no qual foi utilizado o meio MEM, e pela adição de 0,5% de anfotericina B.

As microplacas foram armazenadas a  $37^{\circ}\text{C}$ , em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ , durante 96 horas. Ao final do processo, as células foram fixadas com etanol a 2% e coradas com cristal violeta. Cada poço foi observado em microscópio invertido (objetiva 10x) e as frequências de destruição maior ou igual a 50% nas monocamadas foram tabuladas.

O título viral foi obtido pelo do cálculo descrito por Reed e Muench (1938) e expresso em TCID<sub>50</sub> (*Tissue culture infective dose 50*) na escala logarítmica de base dez ( $\log_{10}$ ).

#### 4.7. Clarificação

As suspensões virais produzidas foram transferidas para tubos Falcon de 50 mL e centrifugadas a 2500 xg, em temperatura de 4°C, durante 10 minutos para remoção dos restos celulares. Os sobrenadantes obtidos foram removidos, transferidos para novos recipientes e incubadas a temperatura de 4°C.

O pellet, composto por restos celulares, foi ressuspendido em 0,5 mL de meio DMEM e homogeneizado durante 1 minuto em vórtex e foi submetido ao processo de ruptura por ondas ultrassônicas (sonicação) para liberação das partículas virais aderidas nas membranas lipídicas, utilizando amplitude de 90 kHz e pulsos alternantes a cada quatro segundos. Posteriormente os debris celulares foram centrifugadas a 2500 xg a 4 °C durante dez minutos e o sobrenadante obtido foi transferido para os recipientes contendo os sobrenadantes da primeira centrifugação. O pellet contendo os debris celulares foi descartado.

As suspensões virais foram tituladas em microplacas de 96 *wells* (Item 4.6) nos momentos pré e pós-clarificação para comparação dos títulos de vírus.

#### 4.8. Inativação Viral

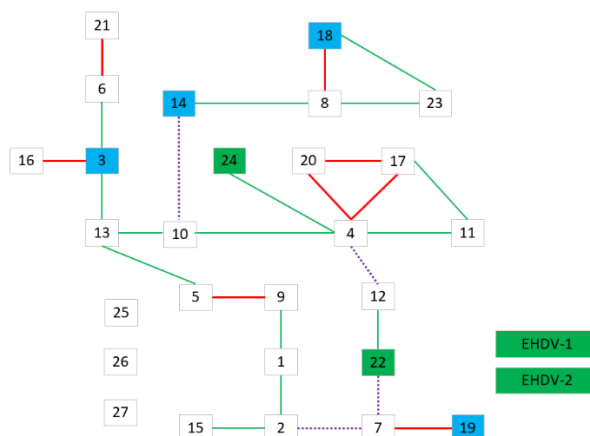
O volume de 15 mL de cada suspensão viral foi inativado individualmente utilizando beta-propiolactona (BPL) segundo o protocolo descrito por Parker et al (1975) com modificações.

Para tanto, foi adicionado 0,2% de BPL nas suspensões virais clarificadas, em câmara de fluxo laminar, seguida de homogeneização em agitador magnético por barras magnéticas estéreis a 37°C durante 2 horas. O pH do meio foi monitorado pela mudança de coloração do indicador de pH (Vermelho de Fenol). Quando houve acidificação do meio (indicado pela coloração amarelo-ouro), foram adicionados, no mínimo, 100 µL de fosfato de potássio ( $K_2HPO_4$  1 M) para neutralização do pH (indicado pela coloração vermelha do meio). Este procedimento foi realizado a cada virada de coloração e o volume de tampão adicionado foi considerado para o desconto do efeito de diluição.

Posteriormente as suspensões virais foram incubadas a temperatura ambiente (i.e. 25 °C) e permaneceram por duas horas para a hidrólise da BPL remanescente. Ao final do processo de inativação o pH do meio foi aferido em phmetro digital e corrigido para 7.2 - 7.4 quando necessário.

#### 4.9. Preparo das formulações vacinais

A distribuição dos sorotipos de BTV nas vacinas utilizadas foi realizada considerando as similaridades e agrupamentos dos sorotipos, de modo que não houvesse sorotipos do mesmo sorogrupo nas formulações vacinais (Figura 8).



**Figura 8.** Relação filogenética e de neutralização entre os sorotipos de BTV. A neutralização cruzada entre os sorotipos de BTV é indicada por linhas: os traços vermelhos indicam forte proteção cruzada, enquanto os verdes indicam moderada reação e os pontilhados fraca reação. Em azul, estão representados os sorotipos de BTV adicionados na vacina 1, enquanto os sorotipos de BTV e EHDV adicionados na vacina 2 encontram-se destacados em verde.

Os títulos de cada vírus foram definidos após a titulação do sobrenadante clarificado. As formulações vacinais foram preparadas para apresentar títulos de  $5 \times 10^4/125 \mu\text{L}$ .

A composição das vacinas consistiu em 50% do volume ocupado por adjuvantes e 50% ocupados pelos sorotipos virais inativados, sendo que os adjuvantes escolhidos foram o hidróxido de alumínio e saponina. O protocolo de formulação vacinal foi obtido no estudo de Matos et al (2017).

O hidróxido de alumínio (gentilmente cedido pela Dra. Ana Carolina Diniz Matos) foi adicionado em volume final de 10% da solução, enquanto o volume de Saponina a 1 mg/mL (*Quillaja saponaria*) consistiu em 40% do volume final das vacinas. Cada um dos quatro sorotipos virais inativados ocuparam 12,5% do volume final (Quadro 3).

**Quadro 3.** Relação dos vírus e adjuvantes presentes nas duas vacinas produzidas que ocuparam 50% do volume da vacina em 1 mL de formulação vacinal.

	Componente	Volume	% do volume final
Vírus (Vacina 1)	BTV-3	125 $\mu\text{L}$	50%
	BTV-14	125 $\mu\text{L}$	
	BTV-18	125 $\mu\text{L}$	
	BTV-19	125 $\mu\text{L}$	
Adjuvantes	Hidróxido de Alumínio	100 $\mu\text{L}$	50%
	Saponina	400 $\mu\text{L}$	
Vírus (Vacina 2)	BTV-22	125 $\mu\text{L}$	50%
	BTV-24	125 $\mu\text{L}$	
	EHDV-1	125 $\mu\text{L}$	
	EHDV-2	125 $\mu\text{L}$	
Adjuvantes	Hidróxido de Alumínio	100 $\mu\text{L}$	50%
	Saponina	400 $\mu\text{L}$	

#### 4.10. Teste de esterilidade

As vacinas produzidas foram submetidas ao teste de esterilidade pelo método de inoculação direta descrito pela Farmacopéia Brasileira (Brasil, 2010).

Para a pesquisa de bactérias viáveis, foram inoculados 1 mL de cada suspensão vacinal em 5 mL de caldo Tioglicolato e BHI (*Brain Heart Infusion*), seguido de incubação a 37°C em estufas com condições de aerobiose e anaerobiose, durante 14 dias. O mesmo procedimento foi realizado para a pesquisa de fungos, entretanto, utilizou-se o caldo *Sabouraud* dextrose, seguido de incubação a 25°C em condições de aerobiose durante 21 dias.

Os testes foram avaliados diariamente e foram comparados com controles negativos mantidos nas mesmas condições que os inóculos vacinais.

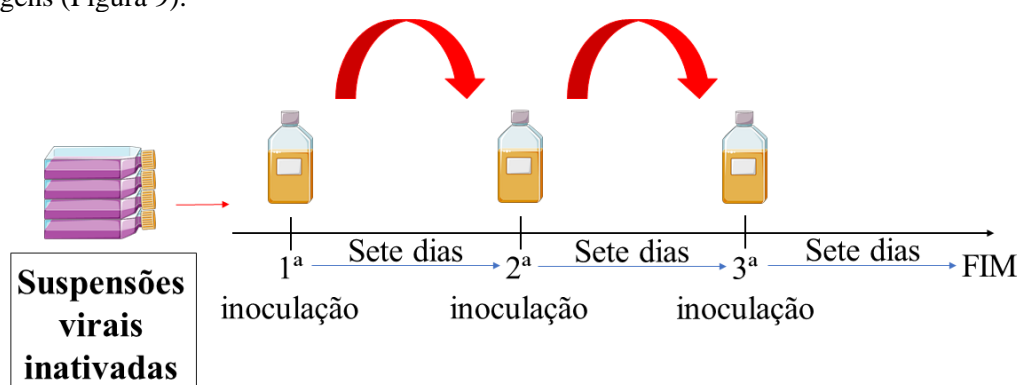
#### 4.11. Teste de inativação viral

Os testes de inativação viral foram realizados de acordo com o protocolo descrito por Macedo (2004).

Para avaliação da eficácia da inativação pela  $\beta$ -propiolactona, 1 mL de cada sorotipo viral inativado foi inoculado em monocamadas de células BHK-21 cultivadas em garrafas plásticas com área de 25 cm<sup>2</sup>, apresentando 90% de confluência.

Após 60 minutos à temperatura de 37°C, foi adicionado meio DMEM contendo 5% de TPB, 0,6% de Glutamax, 2% de SFB e 1% de Penicilina/Estreptomicina nos cultivos celulares. As células permaneceram durante sete dias em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. O controle negativo do teste foi realizado com inoculação de 1 mL de meio DMEM e mantido nas condições das garrafas que receberam a suspensão viral inativada.

Foram realizadas leituras diárias para a pesquisa de efeito citopático. Após sete dias de incubação, as células aderidas ao plástico foram removidas mecanicamente e a suspensão obtida foi inoculada em uma nova garrafa, utilizando o mesmo protocolo supracitado. Ao total foram realizadas três passagens (Figura 9).



**Figura 9.** Representação esquemática das infecções em monocamadas de células BHK-21 realizadas para avaliação da inativação viral pela  $\beta$ -propiolactona.

#### 4.12. Teste de inocuidade

Os testes de inocuidade foram realizados de acordo com o protocolo descrito por Alencar (2002) e Macedo (2004).

Quatro coelhos foram inoculados com 1 mL por animal de uma formulação vacinal sem vírus inativados, contendo uma parte de meio de cultivo DMEM suplementado com soro fetal bovino (2%), caldo tryptose fosfato (5%), glutamina (0,3%) e antibióticos (penicilina/estreptomicina [1%]), e outra parte com 10% de Hidróxido de Alumínio e 40% de Saponina. As formulações foram inoculadas por via subcutânea com o auxílio de agulhas hipodérmicas, no antímero direito, após tricotomia e antisepsia da área.

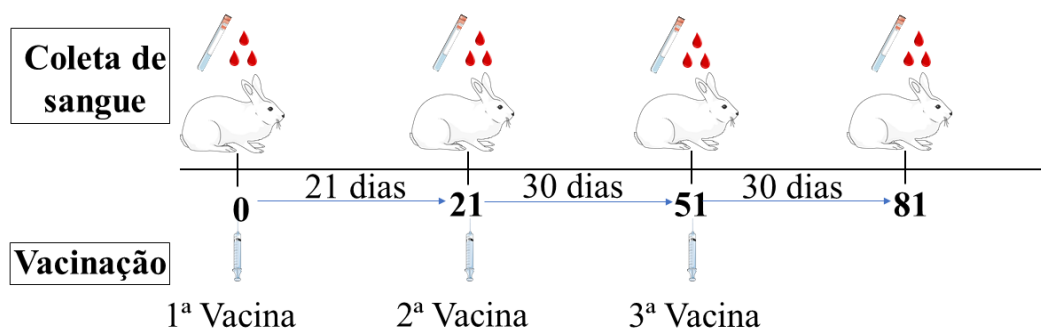
A espessura da pele do local de aplicação e a temperatura retal dos animais foram obtidas, respectivamente, utilizando um paquímetro com graduação milimétrica e termômetro digital. As mensurações foram realizadas no momento pré-inoculação e durante 7 dias após a inoculação. Os animais foram monitorados quanto ao comportamento normal para a espécie quanto presença de dor pela escala Grimace (Hampshire, 2015).

#### 4.13. Testes de potência

Para avaliação da potência (i.e. imunogenicidade) das vacinas foi desenhado um estudo pré-clínico com 15 animais distribuídos equitativamente em três grupos. Os grupos foram nomeados como “Grupo - V1”, “Grupo - V2” e “Grupo - V1 + V2”.

Os animais do grupo “V1” foram inoculados com a formulação quadrivalente contendo os sorotipos BTV-3, BTV-14, BTV-18 e BTV-19 inativados, enquanto os animais do grupo “V2” foram inoculados com os sorotipos BTV-22, BTV-24, EHDV-1 e EHDV-2 inativados (Quadro 3). Os animais do grupo “V1 + V2” receberam as duas formulações quadrivalentes concomitantemente.

Os animais foram primovacinados com 1 mL de cada vacina por via subcutânea e receberam reforços vacinais com intervalos de 21 e 30 dias após a segunda vacinação. As coletas de sangue foram realizadas nos dias 0, 21, 51 e 81 dias de experimentação (Figura 10).



**Figura 10.** Representação esquemática das vacinações e coletas de sangue realizadas nos coelhos. Foram administradas três vacinas nos dias 0, 21 e 51, enquanto as coletas de sangue foram realizadas nos dias 0, 21, 51 e 81 dias de experimentação.

#### 4.14. Soroneutralização em microplaca

A resposta imunológica humoral foi avaliada por meio de testes de soroneutralização em microplacas de 96 poços, segundo protocolo adaptado da OIE (2018) com soros coletados nos dias 0, 21, 51 e 81.

As amostras de soro foram obtidas após centrifugação a 3000 xg por 5 minutos do sangue coletado em tubos sem anticoagulantes. Posteriormente as amostras foram pré-aquecidas a 56° C por 30 min para inativação do sistema complemento, diluídas na base 2 (i.e. 1:2 - 1:256), com volume final de 50 µL/poço em microplacas de 96 poços e incubadas a 37 °C por 60 min com igual volume de uma suspensão contendo 100 doses infectivas dos vírus (TCID<sub>50</sub>) diluídos em meio sem soro. Após o período de uma hora em temperatura de 37°C a 5% de CO<sub>2</sub> foram adicionados 50 µL/poço de uma suspensão contendo 1,6 x 10<sup>3</sup> células VERO em meio de cultivo contendo 6% de soro fetal bovino. As avaliações dos títulos de anticorpos de cada coelho nos diferentes momentos foram realizadas em duplicata.

Os controles da prova foram realizados pelos testes de retrotitulação, contendo 100 TCID<sub>50</sub>, 10 TCID<sub>50</sub>, 1 TCID<sub>50</sub>, 0,1 TCID<sub>50</sub> e 0,01 TCID<sub>50</sub> das suspensões virais, além de controles positivos para o sorotipo específico, controles negativos utilizando soro de coelhos não imunizados e controle de células.

Após 96 horas de incubação a 37°C em atmosfera umidificada e com 5% de CO<sub>2</sub> realizou-se as leituras dos testes.

O título de anticorpos foi definido como o valor recíproco da diluição sérica que resultou em neutralização maior ou igual a 50% da monocamada de células. Os títulos de anticorpos neutralizantes foram expressos em logaritmo de base 2.

#### 4.15. Imunodifusão em gel de ágar

Para detecção de anticorpos precipitantes contra o BTV foi realizado o teste de IDGA segundo o protocolo descrito por Pearson & Jochim (1979). O antígeno utilizado foi produzido a partir BTV-4 cedido pelo centro pan-americano de febre aftosa e o soro padrão foi obtido de um animal positivo para BTV.

Os soros das coelhas coletados no dia 81 (30 dias após a terceira vacinação) foram testados sem diluição (i.e. puro). As leituras foram realizadas com 48 horas após, utilizando-se sistema de iluminação com luz indireta e fundo escuro para visualização de linhas de precipitação antígeno-anticorpo.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Preparo das formulações vacinais

Os títulos obtidos na quarta e quinta infecção em células BHK-21 encontram-se descritos na tabela 4. Os títulos virais da quinta passagem foram diferentes entre os sorotipos tanto no caso de BTV como no de EHDV, com o menor título correspondendo a 10<sup>5,80</sup> TCID<sub>50</sub>/mL e o maior título

correspondendo a  $10^{6,93}$  TCID<sub>50</sub>/mL. Os títulos obtidos foram satisfatórios para a produção das vacinas.

**Tabela 4.** Títulos virais, expressos em TCID<sub>50</sub>/mL, diluição do inóculo e multiplicidade de infecção da quarta e quinta infecção realizada em células BHK-21.

Passagem	Vírus	Título (TCID <sub>50</sub> /mL)	Inóculo e diluição utilizada
Quarta passagem	BTV-3	$10^{7,05}$	3ª passagem (BHK <sub>3</sub> 1:50)
	BTV-14	$10^{6,43}$	
	BTV-18	$10^{6,55}$	
	BTV-19	$10^{7,05}$	
	BTV-22	$10^{6,08}$	
	BTV-24	$10^{5,43}$	
	EHDV-1	$10^{5,80}$	
	EHDV-2	$10^{5,93}$	
Quinta passagem	BTV-3	$10^{6,93}$	4ª passagem (BHK <sub>4</sub> MOI 0,01)
	BTV-14	$10^{6,55}$	
	BTV-18	$10^{6,93}$	
	BTV-19	$10^{5,80}$	
	BTV-22	$10^{6,05}$	
	BTV-24	$10^{6,68}$	
	EHDV-1	$10^{6,93}$	
	EHDV-2	$10^{5,93}$	

A tabela 5 apresenta os títulos obtidos na quinta infecção em células BHK-21 e os títulos finais estimados após o processo de clarificação e após a adição do tampão K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Item 4.8).

**Tabela 5.** Título final estimado dos oito sorotipos utilizados como antígenos vacinais após os processos de sonicação, clarificação e adição do tampão K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Item 4.8).

Sorotipo	Título da 5ª infecção (TCID <sub>50</sub> /mL)	Título pós-clarificação e sonicação (TCID <sub>50</sub> /mL)	Redução (↓) ou aumento (↑) do título pós clarificação e sonicação em TCID <sub>50</sub> /mL <sup>#</sup>	Título final estimado após inativação (TCID <sub>50</sub> /mL)	Redução (↓) do título em TCID <sub>50</sub> /mL
BTV-3	$10^{6,93}$	$10^{6,68}$	↓ $10^{0,25}$	$10^{6,63}$	↓ $10^{0,05}$
BTV-14	$10^{6,55}$	$10^{5,93}$	↓ $10^{0,62}$	$10^{5,90}$	↓ $10^{0,03}$
BTV-18	$10^{6,93}$	$10^{5,80}$	↓ $10^{1,13}$	$10^{5,78}$	↓ $10^{0,02}$
BTV-19	$10^{5,80}$	$10^{6,43}$	↑ $10^{0,63}$	$10^{6,12}$	↓ $10^{0,31}$
BTV-22	$10^{6,05}$	$10^{6,68}$	↑ $10^{0,63}$	$10^{6,61}$	↓ $10^{0,07}$
BTV-24	$10^{6,68}$	$10^{5,80}$	↓ $10^{0,88}$	$10^{5,52}$	↓ $10^{0,28}$
EHDV-1	$10^{6,93}$	$10^{5,93}$	↓ $10^{1,00}$	$10^{5,65}$	↓ $10^{0,28}$
EHDV-2	$10^{5,93}$	$10^{5,30}$	↓ $10^{0,63}$	$10^{5,01}$	↓ $10^{0,29}$

<sup>#</sup>Relação entre o título da quinta infecção e do título pós-clarificação e sonicação; \*Relação entre o título pós-clarificação e sonicação com o título final estimado (após adição de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).

Após os processos de clarificação, observou-se perdas de títulos virais em 75% dos vírus (6/8), com reduções para os vírus BTV-3, BTV-14, BTV-18, BTV-24, EHDV-1 e EHDV-2. Os aumentos foram observados em 25% dos vírus (2/8), ou seja, para o BTV-19 e BTV-22.

As perdas antigênicas durante a clarificação podem estar relacionadas a características desses vírus. Conforme discutido por Mertens (2009), durante a saída de algumas partículas das células infectadas, elas podem brotar ou ficar aderidas às membranas fosfolipídicas, e são denominadas *membrane-enveloped virus particles* (MEVP). Essas membranas são instáveis e não estão envolvidas nos mecanismos de infecção, haja vista que as partículas virais de BTV são não envelopadas. Por esse motivo, o protocolo de sonicação foi utilizado, de modo que os debris celulares fossem rompidos e ocorresse a liberação das partículas virais aderidas nas membranas. Após o processo de clarificação, houve perdas antigênicas na maioria dos vírus utilizados em nossas formulações, que pode ter acontecido no momento da remoção dos debris celulares com vírus associados às membranas, conforme discutido acima.

Esse fenômeno não é relatado na literatura para o EHDV, mas possivelmente também está relacionado aos mesmos mecanismos, devido as semelhanças estruturais entre esses vírus.

A titulação viral das suspensões neutralizadas com  $K_2HPO_4$  não foi realizada pois nesta etapa já se esperava que os vírus estivessem inativados. A adição do  $K_2HPO_4$  é realizada para neutralização do pH ácido resultante da ação da  $\beta$ -propiolactona durante o processo de inativação viral.

A adição do tampão fosfato dipotássico também foi responsável por perdas em virtude do efeito de diluição. Por esse motivo, a concentração final das partículas virais foi estimada pela multiplicação da concentração inicial pelo volume inicial e o resultado foi dividido pelo volume final após a adição do tampão.

As reduções foram maiores para os sorotipos BTV-19, BTV-24, EHDV-1 e EHDV-2, já que os volumes adicionados para cada sorotipo não foram os mesmos, pois a intensidade da acidificação do meio pela  $\beta$ -propiolactona foi diferente entre as formulações, necessitando, portanto, de volumes diferentes para neutralização do pH (Tabela 6).

**Tabela 6.** Volumes de  $K_2HPO_4$  adicionados nas suspensões virais inativadas para neutralização do pH.

<b>Sorotipo</b>	<b>Volume de <math>K_2HPO_4</math> adicionado</b>
BTV-3	1,00 mL
BTV-14	0,40 mL
BTV-18	0,40 mL
BTV-19	1,20 mL
BTV-22	1,40 mL
BTV-24	0,50 mL
EHDV-1	0,40 mL
EHDV-2	0,70 mL

Nesse contexto, com os títulos finais calculados, definiu-se como meta da massa antigênica nas formulações vacinais o valor de  $5,0 \times 10^4$  partículas virais/125 $\mu$ L ( $10^{4,69}$  TCID<sub>50</sub>/125  $\mu$ L), massa antigênica próxima a utilizada por Parker et al (1975) que correspondeu a  $1,56 \times 10^4$ /125  $\mu$ L ( $10^{4,19}$  TCID<sub>50</sub>/125 $\mu$ L).

As amostras que possuíam título mais baixo ou muito próximas de  $5,0 \times 10^4$  partículas virais/125 $\mu$ L foram utilizadas sem nenhuma diluição. O vírus EHDV-2 foi adicionado a 1,25 x



$10^4/125 \mu\text{L}$  porque foi o maior título obtido após o processo de clarificação. A massa antigênica do vírus BTV-22 foi  $4,07 \times 10^6/125\mu\text{L}$

As suspensões virais foram diluídas em meio DMEM e os resultados encontram-se descritos na Tabela 7.

**Tabela 7.** Fatores de diluição dos oito sorotipos virais para a formulação das vacinas inativas.

Vírus	Título/mL	Fator de diluição	Título por mL após diluição*	Título em 125 $\mu\text{L}$ após diluição
BTV-3	$4,26 \times 10^6$	10,6	$4,01 \times 10^5$	$5,02 \times 10^4$
BTV-14	$7,94 \times 10^5$	1,99	$3,98 \times 10^5$	$4,98 \times 10^4$
BTV-18	$6,0 \times 10^5$	1,51	$3,97 \times 10^5$	$4,96 \times 10^4$
BTV-19	$1,32 \times 10^6$	3,30	$4,00 \times 10^5$	$5,00 \times 10^4$
BTV-22	$4,07 \times 10^6$	-	$4,07 \times 10^6$	$5,09 \times 10^5$
BTV-24	$3,31 \times 10^5$	-	$3,31 \times 10^5$	$4,13 \times 10^4$
EHDV-1	$4,47 \times 10^5$	-	$4,47 \times 10^5$	$5,58 \times 10^4$
EHDV-2	$1,00 \times 10^5$	-	$1,00 \times 10^5$	$1,25 \times 10^4$

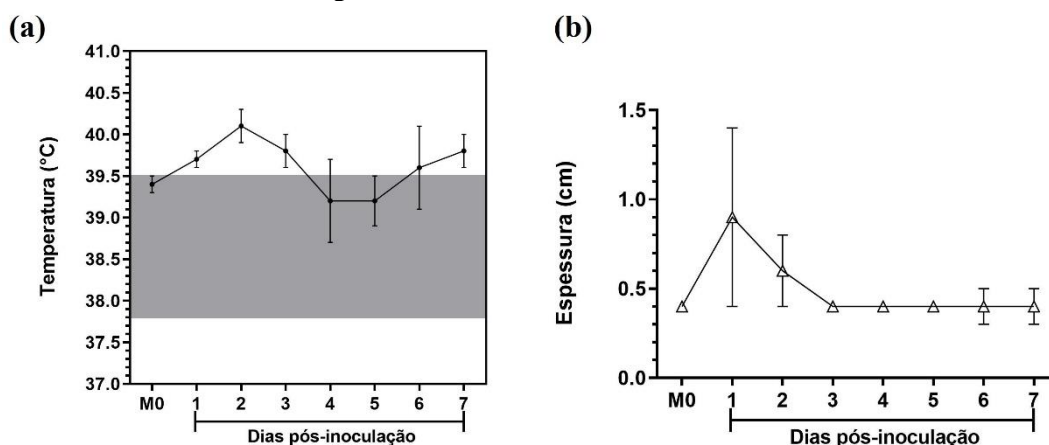
## 5.2. Testes de inativação viral e esterilidade

No tocante dos testes de esterilidade, não foi observada a presença de qualquer tipo de contaminante na pesquisa de bactérias aeróbicas, bactérias anaeróbicas e fungos.

Não houve efeito citopático nas monocamadas de células BHK-21 inoculadas com as suspensões virais inativadas pela  $\beta$ -propiolactona após três passagens.

## 5.3. Testes de inocuidade

Os resultados da temperatura corporal e a espessura da pele no ponto de inoculação da vacina encontram-se descritos na figura 11.



**Figura 11.** Resultados dos testes de inocuidade realizado em quatro coelhos da raça Nova Zelândia. A “figura 11a” apresenta as médias de temperatura corporal (pontos) e o erro padrão da média (traços) das análises realizadas durante sete dias. A área hachurada representa os valores de normalidade para coelhos. A “figura 11b” apresentam as médias de espessura de pele (triângulos) e as amplitudes mínima e máxima (traços) obtidas. Legenda: M0 = Momento 0 (pré-vacinação).

O momento pré-vacinação foi o controle do teste. Foi possível observar que, neste momento, a temperatura corporal média dos animais encontrava-se dentro dos valores de referência segundo Pessoa (2014) e a espessura no ponto de inoculação foi igual a 0,4 cm para os quatro animais.

Nos dias posteriores, observou-se aumento da temperatura corporal associada com o aumento da espessura no ponto de inoculação. As variáveis espessura e temperatura retornaram para os valores normais no terceiro e quarto dia, respectivamente. Não foram observados sinais de dor e/ou desconforto segundo a escala de Grimace, descrita por Hampshire (2015). As temperaturas médias apresentaram-se acima dos valores de referência no sexto e sétimo dia de acompanhamento.

As alterações da espessura de pele e temperatura observadas no teste de inocuidade do presente estudo provavelmente estão relacionadas ao estímulo imunogênico induzido pelos adjuvantes, conforme já discutido por Tizard (2014) e Awate et al (2013) e o aumento da temperatura corporal nos últimos dias de avaliação possivelmente ocorreu devido a manipulação dos animais, pois segundo Couto (2002), ponderando sobre a manipulação dos animais durante a experimentação, o estresse pode gerar discretos aumentos da temperatura, sem necessariamente estar relacionado à síndrome febre.

Em cervídeos, o uso de hidróxido de alumínio associado com saponina não demonstrou reações adversas locais e sistêmicas em cervos vermelhos após administração de duas doses, com intervalo de 28 dias, usando vacinas comerciais bivalentes contendo os vírus BTV-1 e BTV-8, segundo o estudo realizado por Lorca-Oró et al (2012), o que nos levou a selecionar esses adjuvantes como candidatos para a formulação vacinal nos cervídeos de Itaipu.

O hidróxido de alumínio é responsável pela liberação controlada do antígeno no local da inoculação através do efeito de depósito, enquanto a saponina estimula o sistema imunológico pela inibição da tolerância imunológica, aumentando a interação de moléculas coestimulatórias e estímulo seletivo de uma resposta de linfócitos T auxiliares, subtipo 1 (Bhanuprakash, 2009). A relação sinérgica entre os dois adjuvantes utilizados favorece a resposta imune humoral, já que o uso de vacinas inativadas favorecem pouco estímulo ao sistema imunológico, já que os vírus são incapazes de replicar e induzir uma resposta imunológica satisfatória.

As informações sobre o uso de adjuvantes e do uso de vacinas contra o BTV e EHDV em cervídeos na literatura é escassa. Por esse motivo, novos estudos de inocuidade serão realizados nas espécies de cervídeos de Itaipu no momento oportuno das vacinações, pois reações locais ou sistêmicas exacerbadas poderiam colocar em risco a vida dos animais vacinados, prejudicando o objetivo do presente trabalho que consiste na conservação dessas espécies que estão ameaçadas de extinção.

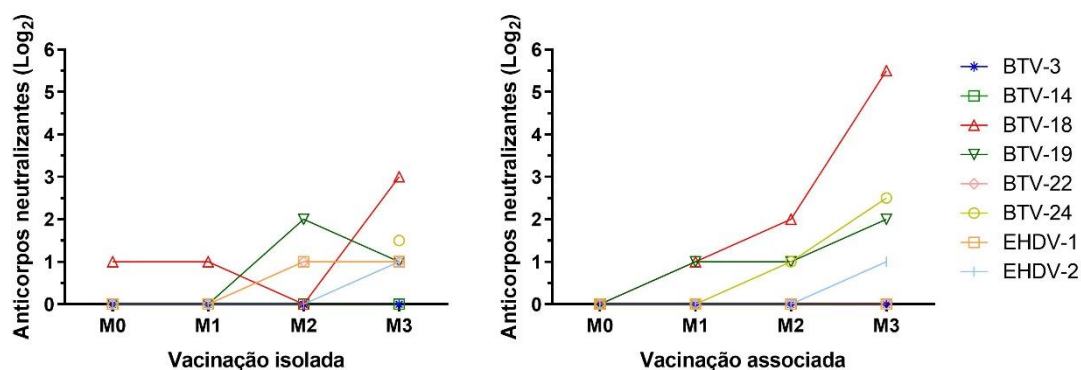
#### 5.4. Soroneutralização em microplaca

A avaliação da resposta imune induzida pela vacinação isolada (V1 ou V2) e associada (V1 + V2) encontra-se descritos na Figura 13. A partir dos dados obtidos é possível observar que, segundo a resposta individual, três animais do grupo “V1” e dois animais do grupo “V1 + V2” apresentaram anticorpos na diluição 1:2 quando foi verificado o momento pré-vacinação do sorotipo BTV-18. Também foi observado que um animal do grupo “Vacina 1+2” apresentou anticorpos contra o sorotipo BTV-24 no momento pré-vacinação.

É improvável que a presença desses anticorpos neutralizantes no momento pré-vacinação seja oriunda de infecção natural com o sorotipo homólogo. A hipótese provável é que a reação de neutralização nos animais positivos 1:2 no momento pré-vacinação possa estar relacionada a reações inespecíficas, pois nessa diluição a alta concentração de proteínas séricas presentes na amostra de soro pode bloquear a ligação da VP2 com os receptores celulares. No estudo de Lobato (1994) a diluição de 1:2 apresentou neutralização com soro de coelhos no momento pré-vacinação, portanto a autora considerou como ponto de corte da reação a diluição 1:4.

Prasad et al. (2018) também observaram efeitos neutralizantes em diluições no momento pré-vacinação em um experimento que utilizou uma vacina polivalente em ovelhas contendo cinco antígenos de BTV (BTV-1, BTV-2, BTV-10, BTV-16 e BTV-23) (Tabela 1). Neste estudo, os pesquisadores consideraram a diluição 1:6 ( $2,58 \text{ Log}_2$ ) como ponto de corte e todos os sorotipos, com exceção do BTV-1, apresentaram resultados positivos no momento pré-vacinação. Interessante observar que no ensaio de ELISA realizado, no qual são pesquisados anticorpos contra a proteína VP7, não houve detecção de anticorpos totais no momento zero.

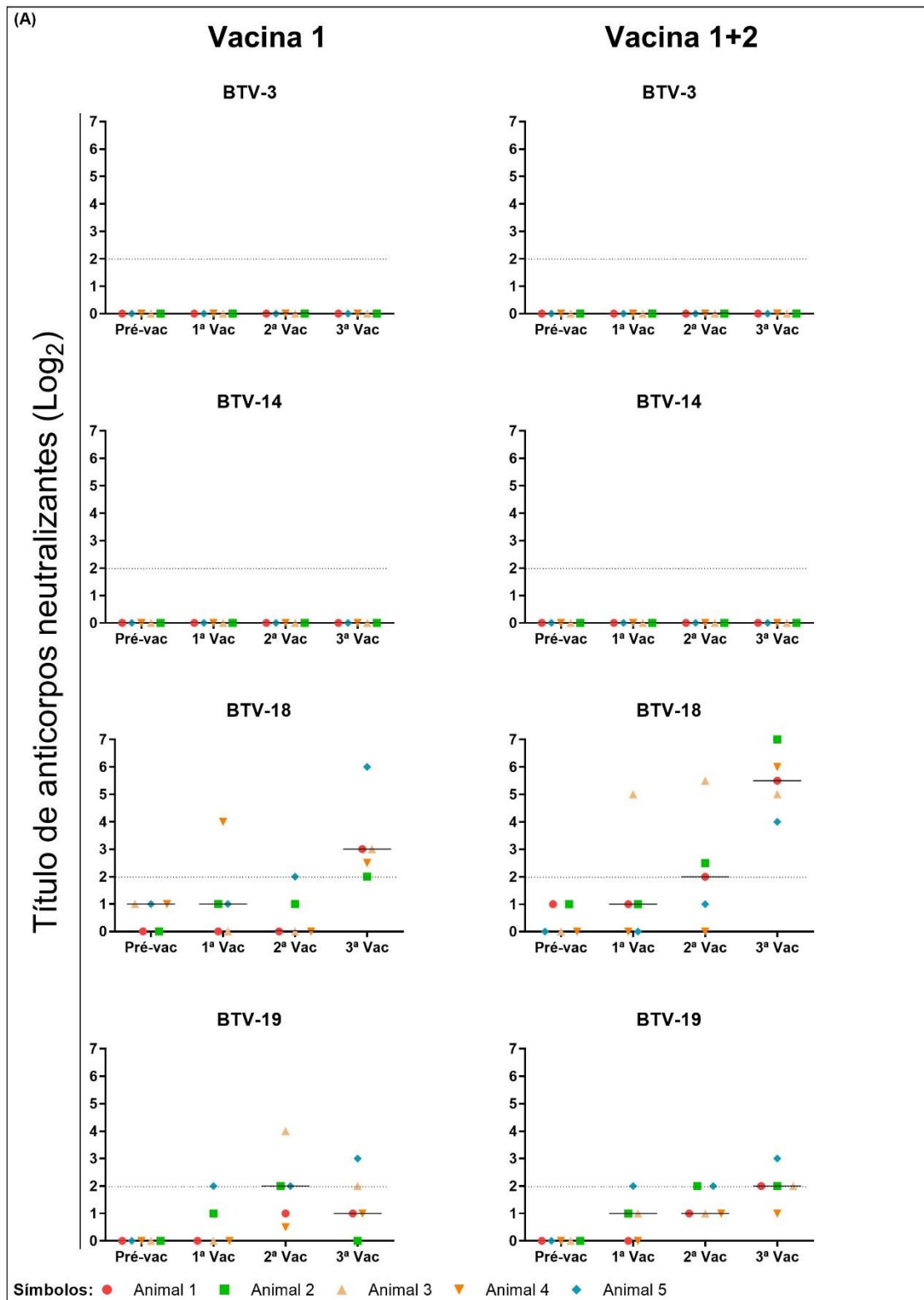
A seguir, são apresentados os resultados da soroneutralização considerando o ponto de corte  $\geq 1:4$  do presente trabalho, considerando as medianas obtidas nos quatro pontos de avaliação (Figura 12).

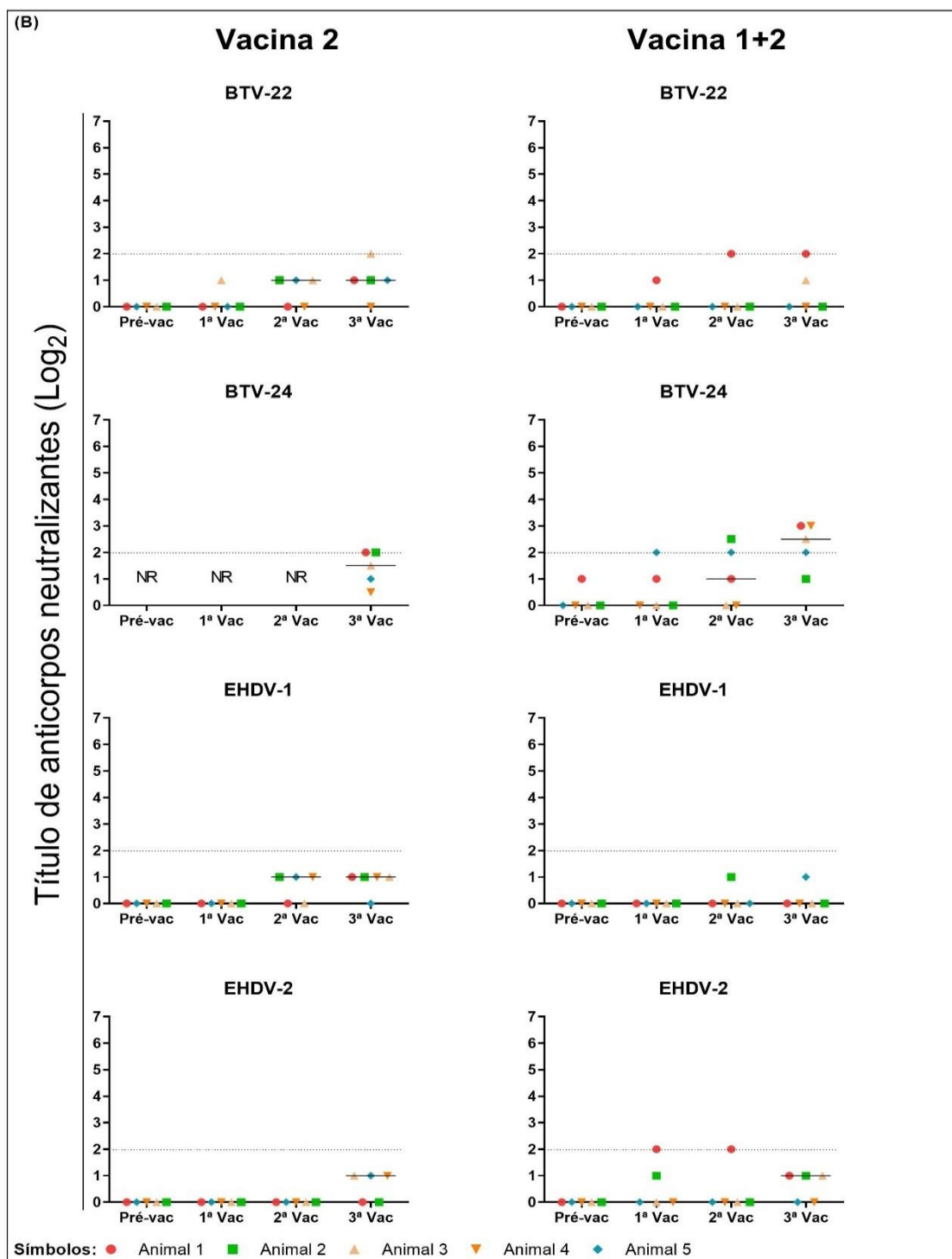


**Figura 12.** Mediana do título de anticorpos neutralizantes, expressos em  $\text{Log}_2$ , no momento pré-vacinação e após as três vacinações isoladas e associadas. Legenda: M0 = Momento 0 (Primovacinação); M1 = Momento 1 (21 dias); M2 = Momento 2 (51 dias); M3 = Momento 3 (81 dias).

Não houve soroconversão para os sorotipos BTV-3, BTV-14, EHDV-1 e EHDV-2 em nenhum dos grupos e em nenhum dos três tempos testados.

Os primeiros resultados de soroconversão puderam ser observados a partir do 21º dia após a primovacinação, apenas em respostas biológicas individuais, ou seja, alguns animais soroconverteram, mas as medianas de todos os vírus permaneceram iguais a zero (Figura 13). Alguns vírus apresentaram mediana igual a 1:2, mas foram consideradas como negativas pois, como já discutido, o ponto de corte foi considerado  $\geq 1:4$ .





**Figura 13.** Resultados dos testes de soroneutralização em microplaca dos grupos vacinados com uma vacina quadrivalente isolada e vacinados com as duas vacinas quadrivalente associadas. Os resultados individuais de cada animal estão representados pelos pontos e foram transformados para  $\text{Log}_2$ . Os números representam a identificação individual dos animais. Os traços indicam a mediana do título de anticorpos. Legenda: Pré-vac = pré-vacinação; NR – Não realizado.

Nossos resultados foram semelhantes a soroconversão dos coelhos avaliados no ensaio pré-clínico realizado por Macedo (2004). Esse trabalho, que também avaliou a presença de anticorpos neutralizantes aos 21 dias pós-vacinação, demonstrou que alguns animais desenvolveram resposta, mas quando as medianas foram avaliadas observaram-se resultados negativos.

O uso de vacinas inativadas tem como desvantagem a necessidade de múltiplas doses para indução de uma boa resposta imune humoral. Nesse contexto, várias vacinações devem ser realizadas para que se obtenha títulos de anticorpos satisfatórios, conforme discutido por Bhanuprakash (2009) e Rijn (2019). Baseado nessa afirmação, e devido a baixa dose antigênica, dois *boosters* foram realizados.

Nas análises realizadas 30 dias após a segunda vacinação foi observado, para o grupo vacinado com uma única vacina, apenas um animal positivo para BTV-18, três animais positivos (com aumento da mediana para o vírus BTV-19) e apenas um animal positivo para BTV-22 (Figura 13).

Para o grupo “Vacina 1+2”, houve aumento de anticorpos (e da mediana) para o sorotipo BTV-18, apenas dois animais positivos para os vírus BTV-19 e BTV-24, e aumento do título em um animal para o vírus BTV-22 (Figura 13).

Na segunda vacinação realizada em coelhos por Macedo (2004), foi observado o aumento da mediana nos grupos que utilizaram como adjuvante Emulsão Múltipla e Microemulsão e na mediana do grupo hidróxido de alumínio, após 14 dias da segunda vacinação, conferindo, portanto, o efeito esperado. Em nosso estudo, foi observado mediana máxima após o *booster* igual a dois ( $\text{Log}_2$ ) para os sorotipos BTV-19 e BTV-18 nos grupos “vacina 1” e vacina “1+2”, respectivamente, o que representa resultados positivos, segundo o ponto de corte estabelecido.

Os baixos títulos de anticorpos para alguns sorotipos obtidos após a segunda vacinação nos levaram a realizar mais um *booster* objetivando melhores resultados. Nesse contexto, 30 dias após a segunda vacinação (81 dias totais de experimentação) as amostras foram testadas e foi observado diferentes comportamentos nos títulos de anticorpos entre os vírus.

No grupo “V1 e V2”, houve um excelente efeito do *booster* para o BTV-18, com mediana equivalente a três ( $\text{Log}_2$ ), e 100% dos animais positivos. Apenas um animal foi positivo para o BTV-22 e dois foram positivos para o BTV-19 e BTV-24. Todas as medianas dos demais vírus, com exceção dos valores do BTV-18, foram consideradas como resultados negativos.

No grupo “V1+V2” também foi observado excelente resposta para o BTV-18, com 100% dos animais positivos, no qual a mediana máxima desse trabalho foi observada (i.e. 5,5  $\text{Log}_2$ ). Também foi observado grande aumento da mediana e resposta individual contra o BTV-19, BTV-24, e apenas um animal positivo para o BTV-22.

Os resultados da última avaliação demonstraram que houve o efeito esperado para alguns vírus, mas não atingimos o objetivo que era o aumento do título para todos os vírus testados.

A relação de animais positivos após a última vacinação, considerando o ponto de corte  $\geq 1:4$  no teste de soroneutralização encontram-se descritas na tabela 8.

**Tabela 8.** Relação de animais positivos, segundo o ponto de corte (diluição 1:4), nos grupos V1, V2 e V1+V2 obtidos 30 dias após a última vacinação.

	V1		V2		V1+V2	
	Valor absoluto	%	Valor absoluto	%	Valor absoluto	%
<b>BTV-3</b>	0/5	0			0/5	0
<b>BTV-14</b>	0/5	0			0/5	0
<b>BTV-18</b>	5/5	100			5/5	100
<b>BTV-19</b>	2/5	40			4/5	80
<b>BTV-22</b>			1/5	20	1/5	20
<b>BTV-24</b>			2/5	40	4/5	80
<b>EHDV-1</b>			0/5	0	0/5	0
<b>EHDV-2</b>			0/5	0	0/5	0

É possível observar pela análise da tabela acima que a vacinação associada (grupo V1+V2) demonstrou melhor resposta biológica individual quando comparada à vacinação isolada. O mesmo pode ser concluído quando as medianas dos quatro pontos de avaliação são comparadas (Figura 12). Embora não seja possível concluir se esse fenômeno é significativo pela ausência de análises estatística, esses resultados são promissores no tocante da vacinação em cervídeos, pois a vacinação associada poderá ser uma importante ferramenta para reduzir a manipulação desses animais e facilitar as aplicações, pois nesse caso, será possível aplicar cada vacina em um antímero diferente.

A melhor resposta observada na vacinação associada também tem como ponto positivo a produção dessas vacinas. A vacinação associada permite distribuir os oito vírus em duas vacinas distintas. Se fosse necessário formular apenas uma vacina, a participação de cada sorotipo na vacina dificultaria a manutenção de uma massa antigênica apropriada para os oito vírus, já que cada vírus ocuparia metade do espaço das formulações desenvolvidas nesse trabalho.

Para avaliar a presença de anticorpos totais nas amostras de soro da terceira coleta, estas foram submetidas ao teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) contra antígenos do BTV e os resultados obtidos encontram-se descritos na tabela 9. Não foram realizados testes contra os antígenos do EHDV pela ausência de antígeno padrão no momento deste estudo.

**Tabela 9.** Relação de animais positivos no teste de soroneutralização (resultados expressos em  $\text{Log}_2$ ), segundo o ponto de corte (diluição 1:4), e no teste de imunodifusão em gel de ágar após 30 dias da última vacinação nos grupos V1, V2 e V1+V2.

Coelho 1	V1		V2		V1+V2	
	SN	IDGA	SN	IDGA	SN	IDGA
BTV-3	Negativo		-		Negativo	
BTV-14	Negativo		-		Negativo	
BTV-18	3,0	Todos animais positivos	-	Todos animais positivos	5,0	Todos animais positivos
BTV-19	Negativo		-		2,0	
BTV-22	-		Negativo		2,0	
BTV-24	-		2,0		3,0	
<b>Coelho 2</b>						
BTV-3	Negativo		-		Negativo	
BTV-14	Negativo		-		Negativo	
BTV-18	2,0	Todos animais positivos	-	Todos animais positivos	7,0	Todos animais positivos
BTV-19	Negativo		-		2,0	

BTV-22	-		Negativo		Negativo	
BTV-24	-		2,0		Negativo	
<b>Coelho 3</b>						
BTV-3	Negativo		-		Negativo	
BTV-14	Negativo		-		Negativo	
BTV-18	3,0	Todos animais positivos	-	Todos animais positivos	5,0	Todos animais positivos
BTV-19	2,0		-		2,0	
BTV-22	-		2,0		Negativo	
BTV-24	-		Negativo		2,5	
<b>Coelho 4</b>						
BTV-3	Negativo		-		Negativo	
BTV-14	Negativo		-		Negativo	
BTV-18	2,5	Todos animais positivos	-	Todos animais positivos	6,0	Todos animais positivos
BTV-19	Negativo		-		Negativo	
BTV-22	-		Negativo		Negativo	
BTV-24	-		Negativo		3,0	
<b>Coelho 5</b>						
BTV-3	Negativo		-		Negativo	
BTV-14	Negativo		-		Negativo	
BTV-18	6,0	Todos animais positivos	-	Todos animais positivos	4,0	Todos animais positivos
BTV-19	3,0		-		3,0	
BTV-22	-		Negativo		Negativo	
BTV-24	-		Negativo		2,0	

A partir da comparação dos resultados de anticorpos neutralizantes com anticorpos precipitantes é possível observar que no grupo V2 alguns coelhos apresentaram resultados negativos no teste de soroneutralização, mas apresentaram resultados positivos no IDGA. Anticorpos precipitantes são oriundos da formação de imunocomplexos com proteínas estruturais (principalmente VP7) e não estruturais (NS1). A proteína NS1, por exemplo, é a proteína com maior produção durante o processo de replicação viral e estão presentes em altas concentrações nas suspensões de vírus obtidos em cultivos de células. Portanto, os resultados da linha de precipitação observada nos coelhos são, provavelmente, decorrentes de uma resposta a várias proteínas da partícula viral, enquanto a soroneutralização detecta apenas anticorpos anti-VP2/VP5 com função biológica de neutralização, que é a ação relacionada à proteção da infecção. Os demais anticorpos são importantes para ações como opsonização e ativação do sistema complemento e participam de outros tipos de respostas imunológicas, porém eles não impedem a infecção celular.

Os resultados do IDGA demonstram que 100% dos coelhos foram imunizados contra o BTV, mas que não necessariamente foram induzidos anticorpos neutralizantes contra todos os vírus inoculados. O mesmo fenômeno foi observado no estudo de Lobato (1994), onde alguns coelhos apresentam anticorpos totais em altas concentrações no teste de ELISA para os recombinantes expressando VP2+VP5 (teste equivalente ao IDGA), mas quando o teste de soroneutralização era realizado, alguns animais eram negativos ou apresentavam baixos títulos de anticorpos neutralizantes.

Os hospedeiros infectados pelos vírus BTV e EHDV desenvolvem vários tipos de respostas imunes, as quais incluem anticorpos específicos para sorotipos e sorogrupos e respostas imunes celulares (Darpel et al., 2009). As respostas específicas para cada sorotipo são direcionadas conforme a proteína VP2 onde são gerados anticorpos neutralizantes, enquanto as respostas direcionadas ao sorogrupo são direcionadas contra a VP7, proteína fortemente imunodominante



que podem ser usados para o diagnóstico e identificação de qualquer cepa por ELISA ou IDGA. O papel dos anticorpos não neutralizantes é pouco esclarecido na literatura (Darpel et al., 2009).

No presente estudo, a resposta imune humoral foi escolhida para investigação em virtude da utilização de vírus inativados nas vacinas, onde a resposta imunológica predominante é a do tipo Th2 (*T helper 2*), em virtude da apresentação de antígeno via complexo principal de histocompatibilidade de classe II. Essa resposta estimula a produção e diferenciação de linfócitos B para plasmócitos principalmente por meio da interleucina-4.

O critério de avaliação da eficácia para vacinas contra a LA e DEH nos estudos disponíveis na literatura são realizados exclusivamente por soroneutralização em microplacas e ELISA. No presente trabalho a técnica de ELISA foi substituída pelo IDGA, já que a resposta obtida entre os dois testes é equivalente em relação ao tipo de resposta induzida (neutralizante ou não). Não há um consenso entre o título de anticorpos neutralizantes necessário para proteção efetiva contra a infecção, visto que algumas vacinas inativadas podem conferir proteção mesmo na ausência de anticorpos neutralizantes. Nesse contexto, a melhor forma de avaliação da eficácia é realizada por meio de vacinação seguida do desafio na espécie alvo.

Sobre a ausência de resposta de anticorpos neutralizantes para alguns vírus nos coelhos, não podemos concluir que o mesmo ocorrerá nos cervídeos, já que o repertório de linfócitos B é diferente entre as duas espécies. No estudo de Lobato (1994) foi observado que títulos de anticorpos neutralizantes foram inferiores em coelhos quando comparados a ovinos vacinados com as mesmas proteínas do BTV-1 (VP2+VP5) expressas por vetores vacinais (vírus vaccínia). Embora não seja possível correlacionar imunogenicidade em coelhos e ruminantes, Lobato (1994) observou que títulos iguais a 1:8 na soroneutralização em coelhos induziu respostas nas ovelhas e foi protetor após o desafio com o vírus homólogo. Assim, os resultados de imunogenicidade em coelhos poderão induzir respostas nos cervídeos e ser protetora frente a infecção.

Além disso, deve-se considerar que apesar da evidência de neutralização por anticorpos, Schawartz-Cornil et al. (2008) discutem que o nível de anticorpos neutralizantes nem sempre estão correlacionados com o grau de proteção após a vacinação com BTV e algumas vacinas inativadas podem conferir proteção na ausência de anticorpos neutralizantes.

Foram observados que os vírus BTV-18, BTV-19 e BTV-24 induziram, nessa ordem, os maiores títulos de anticorpos. A observação desse efeito é importante para os ajustes antigênicos nas vacinas seja feito, de modo que a indução de anticorpos neutralizantes ocorra para todos os vírus introduzidos nas vacinas. Essa observação deverá ser levada em consideração na formulação das vacinas para cervídeos.

A interferência entre sorotipos em vacinas polivalentes para o BTV já é relatada na literatura. Savini et al. (2004) observaram o efeito imunodominante *in vivo* e *in vitro* do sorotipo BTV-2 sobre o BTV-9 em uma vacina bivalente atenuada administrada em ovinos. Os títulos de anticorpos neutralizantes 25 dias pós-vacinação para o BTV-2 foram superiores aos do BTV-9. Na avaliação da viremia induzida pela replicação dos vírus vacinais, o BTV-2 apresentou títulos maiores que o BTV-9, demonstrando a dominância *in vivo*.

No estudo de Parker et al. (1975), foi avaliado o efeito da soroconversão de uma vacina inativada bivalente contendo os vírus BTV-3 e BTV-4 com adjuvante oleoso em ovinos. Os autores compararam a soroconversão desses vírus em formulações monovalentes com outra formulação

bivalente com os mesmos vírus. Foi observado que isoladamente o vírus BTV-4 induziu títulos de anticorpos neutralizantes mais altos que o BTV-3, mas quando os dois vírus foram administrados na mesma vacina, a resposta contra o BTV-3 foi maior.

No estudo de Prasad et al. (2018) que utilizou uma vacina polivalente inativada contendo os vírus BTV-1, BTV-2, BTV-10, BTV-16 e BTV-23 em ovinos e caprinos, foram observados menores títulos de anticorpos para o vírus BTV-1 nos ovinos, após 32 dias da última vacinação, e menores títulos para o BTV-1, BTV-2 e BTV-16 nos caprinos após 32 dias da última vacinação, porém não estão descritas as informações sobre a massa viral utilizada para cada sorotipo, dessa forma não é possível inferir se houve competição antigênica ou se a resposta foi diferente em virtude da diferença da massa antigênica.

Apesar de os estudos de Parker et al. (1975) e Prasad et al. (2018) não terem usado ferramentas estatísticas, é possível inferir que as diferenças encontradas em relação a presença de anticorpos são importantes e que provavelmente estão relacionadas a efeitos de dominância/competição antigênica entre os sorotipos.

Além da competição antigênica, outra questão importante no desenvolvimento de vacinas para o BTV e EHDV são as reações cruzadas entre sorotipos. Neste estudo, a disposição dos sorotipos entre as vacinas foi realizada para que não houvessem sorotipos do mesmo sorogrupo dentro da mesma vacina, pois isso poderia interferir nos resultados de soroneutralização, ou seja, não seria possível distinguir se a presença de anticorpos neutralizantes era homóloga ao vírus testado ou se poderia ser reações cruzadas entre os sorotipos. Além disso, a presença de oito vírus circulantes pertencentes a diferentes sorogrupos permitirá avaliar *in vivo* se existe alguma proteção cruzada, caso exista a emergência de novos sorotipos de BTV ou EHDV na reserva biológica.

No tocante aos adjuvantes, foram utilizados os mesmos produtos de vacinas inativadas para o BTV e EHDV, ou seja, hidróxido de alumínio associado com a saponina, segundo os trabalhos revisados (Hamers et al., 2009; Zanolari, 2010; Oura, Edwards, Batten, 2012; Lorca-Oró et al., 2012; Batten, 2013; Breard, 2015; Hilke, 2019).

O uso de hidróxido de alumínio no estudo de Macedo (2004) em coelhos induziu uma resposta equivalente aos títulos obtidos de formulações vacinais sem adjuvantes, ou seja, não foi eficaz no refinamento da resposta imune. Em virtude desse resultado, foi associado outro adjuvante (i.e. saponina) para aumento da eficácia, baseado no trabalho de Matos et al. (2017) que observou relação sinérgica entre os dois adjuvantes na indução de anticorpos contra o vírus vaccínia inativado em camundongos vacinados com duas doses da formulação e baseado na observação da segurança com o uso desses adjuvantes em cervídeos relatado por Lórca-Oro et al. (2012). A vantagem da adição de saponina, segundo Spickler e Roth (2013), está associada ao estímulo das respostas de linfócitos T *helper* e das respostas inflamatórias inespecíficas.

Mesmo com a escolha de adjuvantes com eficácia já demonstrada em outros estudos, é possível que a massa antigênica possa ter interferido, não induzindo, para alguns sorotipos, resposta humoral satisfatória.

A massa antigênica utilizada nas vacinas é uma variável importante na indução da resposta imune. Para realização deste estudo foi decidido que tentaríamos manter, na medida do possível, uma massa antigênica semelhante entre os sorotipos que compunham a vacina.

Assim, foram utilizados valores médios de  $5 \times 10^4$  partículas virais/125 $\mu$ L de cada sorotipo, com exceção do BTV-22 que apresentou massa antigênica maior, e o EHDV-1 e EHDV-2 que apresentaram massa antigênica menor, o que pode ter interferido na resposta imune para esses três vírus. O EHDV-1 e EHDV-2 apresentaram resultados negativos em todos os momentos, talvez em virtude da menor massa quando comparada aos outros vírus, enquanto o BTV-22 apresentou maior massa e mesmo assim não induziu resposta satisfatória como os vírus BTV-18, BTV-19 e BTV-24.

Um importante limitante na determinação e formulação do título mínimo viral que será utilizado na composição das vacinas é a capacidade de crescimento e produção de partículas virais infecciosas em cultivo celular uma vez que são as suspensões celulares que são utilizadas para confecção das vacinas. As amostras que utilizamos foram isoladas de campo e, portanto, não eram adaptadas em cultivo celular. Por outro lado, múltiplas passagens em cultura de células podem levar à alterações antigênicas importantes e podem ocorrer justamente em populações que melhor se adaptam para o crescimento *in vitro*.

Dessa forma, determinamos a variável número máximo de passagens em cultura de células, que foi igual a cinco e observamos o título máximo obtido com cada sorotipo. A partir daí, considerando também a informação contida na literatura em relação à massa antigênica das vacinas inativadas para estes orbivírus, determinamos a quantidade de partículas viras mais homogênea possível para todos os sorotipos na formulação das vacinas.

As amostras de EHDV-1 e EHDV-2 apresentaram títulos muito baixos e entraram na formulação da vacina sem nenhuma diluição, mas ainda assim apresentando carga viral antigênica abaixo da utilizada para os outros sorotipos.

Segundo Rjin (2019), as vacinas inativadas devem utilizar de forma ideal cerca de  $1 \times 10^7$  partículas/mL em suas formulações. Com exceção da menor massa antigênica que correspondeu a  $1,24 \times 10^5$ /mL (Parker et al., 1975), títulos próximos de  $1 \times 10^7$  partículas/mL podem ser observados nos trabalhos revisados que utilizaram vacinas inativadas contra o BTV (Quadro 2) (Parker et al., 1975; Emidio, 2004; Savini, 2007; Wackerlin et al., 2010; Breard et al., 2015; Spedicato et al., 2016; Speiser et al., 2016; Zhugunissova, 2018; Hilke, 2019). Como nossa massa antigênica foi inferior aos valores das vacinas comerciais e inativadas revisados, provavelmente este fato contribuiu para que não obtivéssemos altos títulos de anticorpos como observado por outros autores.

A formulação quadrivalente também interferiu no título dos vírus, pois a somatória do efeito de diluição dos adjuvantes com a participação de cada sorotipo na vacina prejudicou os títulos antigênicos. Se fossem formuladas vacinas monovalentes ou bivalentes, a participação de cada sorotipo nas vacinas seria maior e, conseqüentemente, seria possível adicionar maior massa antigênica no mesmo volume de vacina, porém a necessidade de imunizar os animais de Itaipu com todos os sorotipos isolados, além de minimizar as capturas dos animais para vacinação nos levaram a escolher as formulações quadrivalente assumindo títulos virais mais baixos.

Segundo Macedo (2004), como os antígenos nas vacinas inativadas não apresentam capacidade de replicação, deve-se aumentar a concentração antigênica para uma melhor resposta imune. Em escalas industriais, esse aumento é conseguido com o uso de técnicas de crescimento antigênico por escalonamento em grandes biorreatores, processos de ultracentrifugação e purificação antigênica. Nosso estudo consistiu na produção de vacinas autógenas, que frequentemente são

produzidas em estruturas laboratoriais de menor escala. Além disso, há perdas antigênicas durante os processos de neutralização da inativação e da clarificação, conforme demonstrado nos resultados da produção antigênica. Esses processos contribuíram para baixa massa viral obtida, mas são intrínsecos ao tipo de produção de vacinas autógenas.

A partir dos resultados obtidos, temos como perspectivas futuras testar em novas vacinas o efeito do aumento da massa antigênica com novas passagens visando a melhor adaptação em cultura de células objetivando aumentar o título viral, além de comparar a eficácia do hidróxido de alumínio + saponina com emulsões múltiplas (Montanide ISA) que também são usados em vacinas contra o BTV (Emídio, 2004; Savini, 2007; Zhugunissova, 2018).

Para evitar a necessidade de múltiplas doses exigidas por vacinas inativadas, uma alternativa seria o uso de vacinas atenuadas, pois como demonstrado na revisão de literatura, a potência de uma aplicação isolada é equivalente a magnitude da resposta das vacinas inativadas e elas conferem a vantagem de não precisarem de adjuvantes (Savini et al., 2004; Speiser et al., 2006). Apesar disso, não existem no mercado vacinas atenuadas para cervídeos, o que impossibilita o uso de produtos comerciais importados formulados para bovinos e ovinos. Também já foram explicitadas as desvantagens do uso das vacinas atenuadas para BTV que seriam: risco de recombinação, reversão de virulência, indução de sinais clínicos e queda na produção animal, possibilidade de efeitos teratogênicos, entre outros.

Já em relação às vacinas inativadas comerciais, seu uso também não é possível em virtude da necessidade de proteção sorotipo-específica. Em nossas revisões foi demonstrado a presença de vacinas comerciais inativadas, utilizadas no exterior, contra os vírus BTV-2, BTV-4, BTV-8, BTV-9 (Breard, 2015; Hilke, 2019), que não são correspondentes aos sorotipos circulantes na reserva biológica de Itaipu. Além disso, levantamentos bibliográficos permitem observar que os sorotipos de BTV já descritos em cervídeos e os já descritos em ovinos no Brasil não são comuns aos dois hospedeiros (Baldini et al., 2018). Em cervídeos, há relatos dos vírus BTV-3, 14, 18, 19, 22, 24 e em ruminantes domésticos, até hoje no Brasil, foram descritos os sorotipos BTV-1, 4, 12, e 17 (Lobato et al., 2015).

A falta de interesse comercial pelas indústrias para a produção de vacinas que protejam os cervídeos, além da diferença de sorotipos encontrados em cervídeos e ruminantes domésticos demonstram que as vacinas autógenas são as melhores alternativas para uso e conservação das espécies. Elas conferem a vantagem de protegerem os animais contra os sorotipos específicos circulantes na região, além de não exigirem estruturas laboratoriais complexas para a formulação dos produtos.

Vacinas autógenas são produzidas comercialmente, sob demanda, em laboratórios de diagnóstico no país, entretanto, a potência e eficácia dos lotes dessas vacinas são pouco estudadas antes da comercialização. Nosso estudo permitiu a avaliação da imunogenicidade das vacinas estudadas em ensaios pré-clínicos, o que possibilita obter informações importantes para continuidade do trabalho sobre as vacinas para aplicação em cervídeos de Itaipu. Após observação da imunogenicidade na espécie-alvo, o uso dessas vacinas abrirá oportunidades para vacinação de outros cervídeos brasileiros, contribuindo na conservação das espécies, uma vez que os resultados encontrados nos estudos de prevalência demonstram que os vírus BTV e EHDV estão presentes em cervídeos no Brasil e são responsáveis por causarem infecção e doença clínica nesses animais.

A falta de conhecimento dessas doenças em animais de vida livre e animais de cativeiro, além da falta de diagnóstico no passado contribuíram para a ocorrência e disseminação dessas doenças no país, com impactos negativos na conservação dessas espécies, em virtude das altas taxas de mortalidade observadas nos locais com ocorrência da doença clínica (Pandolfi, 1999; Montassier et al., 2001; Kawanami, 2016; Favero et al., 2013; Kawanami et al., 2018).

Além disso, Baldini et al (2018) discutem que os resultados obtidos com os estudos na reserva biológica de Itaipu permitem concluir que pelo menos os vírus BTV-3, 14, 18, 19, 22, 24, EHDV-1 e EHDV-2 estão circulando no CASIB e causando doença hemorrágica em animais altamente susceptíveis, resultando em altas taxas de mortalidade. Especula-se também que outros sorotipos de BTV, ainda não identificados, também possam estar presentes na região. Caso ocorra coinfeção com esses mais de um sorotipo de BTV ou EHDV existe a possibilidade de rearranjo viral e ocorrência de novos sorotipos com características fenotípicas e patogênicas desconhecidas, justificando a necessidade de controle imediata para que novas mortes não ocorram na reserva biológica.

A evidência da circulação de múltiplos sorotipos em diferentes anos em Itaipu nos leva a concluir que a vacinação com todos os sorotipos conhecidos é importante para proteger os animais, já que na literatura há a evidência da circulação de diferentes sorotipos de BTV nos surtos ocorridos, com substituição desses sorotipos nos anos seguintes (Dungu, 2004). A ocorrência desse fenômeno dificulta a previsão de quais sorotipos irão circular nos anos seguintes, o que justifica novamente a vacinação de todos os animais contra todos os sorotipos isolados, para que novas mortes não ocorram durante novos surtos.

A principal vantagem da imunização dos animais do CASIB será a observação do efeito de proteção conferido pelas vacinas em animais de cativeiro. Caso a proteção seja satisfatória, essa observação permitirá outros estudos com animais mantidos em situação de cativeiro pelo país. Apesar disso, a principal desvantagem é a necessidade de proteção sorotipo-específica, portanto, caso a vacinação de animais em cativeiro seja satisfatória, a implementação desse manejo sanitário deve sempre seguir as características do ambiente, representado principalmente pelo conhecimento dos sorotipos presentes na região.

Em animais de vida livre, a vacinação tem como desvantagem a necessidade de múltiplas doses para indução da resposta imune humoral. A captura de um mesmo animal de vida livre para múltiplas vacinações é laboriosa e muitas vezes impossível. Nesse contexto, para esse tipo de manejo, novos estudos deveriam ser realizados, enfatizando a produção de vacinas com altos títulos virais para que apenas uma dose fosse suficiente para indução da resposta humoral. Apesar dessa desvantagem, o uso de vacinas autógenas inativadas em animais de vida livre é uma excelente estratégia de proteção e conservação dessas espécies.

Estudos futuros permitirão o desenvolvimento e uso de vacinas autógenas em animais de cativeiro e de vida livre. Além da neutralização do vírus, as vacinas podem contribuir na redução dos sinais clínicos e na gravidade da infecção e diminuir a transmissão dos vírus circulantes nos hospedeiros mamíferos aos vetores biológicos, uma vez que podem diminuir a viremia. Vislumbramos, portanto, que as vacinas produzidas no presente trabalho contribuam, com melhorias, para o início de estudos clínicos na espécie-alvo, seja para animais de vida livre ou para animais mantidos em cativeiro.

## 6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nas condições de experimento piloto do presente trabalho é possível concluir que:

1. O uso dos adjuvantes hidróxido de alumínio e saponina em coelhos é seguro;
2. Vacinas com formulações polivalentes dos isolados de BTV e EHDV induzem respostas com diferentes títulos de anticorpos;
3. Houve imunodominância para os vírus BTV-18, BTV-19 e BTV-24 nos animais vacinados com as formulações testadas;
4. O grupo que recebeu as duas vacinas concomitantemente apresentou melhores respostas sorológicas;
5. Três vacinações com as formulações inativadas foram necessárias para o desenvolvimento de títulos de anticorpos neutralizantes mais altos, considerando as condições utilizadas nesse trabalho.

## 7. REFERÊNCIAS

ALENCAR, S. R. Desenvolvimento de vacinas inativadas contra a rinotraqueíte infecciosa bovina e a diarreia bovina a vírus. 2002, 53p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

ALFIERI, A. A. et al. Reoviridae. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. 3a Edição, Editora UFSM, 2017.

ANTONIASSI, N. A. B.; PAVARINI, S. P.; RIBEIRO, L. A. O. et al. Alterações clínicas e patológicas em ovinos infectados naturalmente pelo vírus da língua azul no Rio Grande do Sul. *Pesq Vet Bras*, v.30, p. 1010-1016, 2010.

AWATE, S.; BABIUK, L. A.; MUTWIRI, L. Mechanisms of action of adjuvants. *Front Immunol*, v. 16, n. 4, p. 1-10, 2013.

AYBAR, V. C. A. GOMEZ, R. A. D.; JURI, M. J. D. et al. Potential distribution map of *Culicoides insignis* (Diptera: Ceratopogonidae), Vector of Bluetongue Virus, in Northwestern Argentina. *J. insect, Science*, v. 16. n. 1, p. 1-7, 2016.

BALDINI, M. H. M.; ROSA, J. C. C.; MATOS, A. C. D. et al. Multiple bluetongue virus serotypes causing death in Brazilian dwarf brocket deer (*Mazama nana*) in Brazil. *Vet. Micro.*, p. 2015–2016, 2018.

BARBANTI, J. M.; REIS, M. L. Introdução. In: DUARTE, J. M. B.; BRAGA, F. G.; VOGLIOTTI, A. et al. *Plano Nacional para a Conservação dos cervídeos ameaçados de extinção*. Brasília: Icmbio. 2012. 66 p.

BATTEN, C. A.; EDWARDS, L.; OURA, C. A. L. Evaluation of humoral immune responses in adult cattle and sheep, 4 and 2.5 years post-vaccination with a bluetongue virus serotype 8 inactivated vaccine. *Vaccine*, v. 31, n. 37, p. 3783-3785, 2013.

BELBIS, G.; ZIENTARA, S.; BRÉARD, E. et al. Bluetongue Virus: From BTV-1 to BTV-27. *Advances in Virus Research*, v. 99, p. 161-186, 2017.

BHANUPRAKASH, V.; INDRANI, B. K.; HOSAMANI, M. et al. Bluetongue vaccines: the past, present and future. *Expert review vaccines*, v. 8, n. 2, p. 191-204, 2009.

BIANCHI, R. M.; PANZIERA, W.; FACCIN, T. et al. Aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos de surtos de língua azul em ovinos na Região Central do Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 37, n. 37, p. 1443-1452, 2017.

BRASIL (24 de setembro de 2013). *Instrução normativa nº 50, de 24 de Setembro de 2013*. Fonte: Descreve as principais enfermidades animais de notificação obrigatória. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/>>. Acesso em 07. nov. 2018.

BRASIL. **Biodiversidade Brasileira**. 2019. Disponível em: <<https://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>>. Acesso em: 20 ago. 2019.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 5 ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010, 546p.

BREARD, E.; BELBIS, G.; VIAROUGE, C. et al. Evaluation of adaptive immune responses and heterologous protection induced by inactivated bluetongue virus vaccine. *Vaccine*, v. 33, n. 4, p. 512-518, 2015.

CHAGAS, A. C. S.; PINHEIRO, R. R.; Língua Azul: Conhecer para prevenir. *Embrapa*, v. 1, n.49, p. 1-34, 2003.

CLAVIJO, A.; SEPULVEDA, L.; RIVA, J. et al. Isolation of bluetongue virus serotype 12 from an outbreak of the disease in South America. *Vet Rec*, v. 151, p. 301-302, 2002.

COETZEE, P.; STOKSTAD, M.; VENTER, E.H.; MYRMEL, M.; VANVUUREN, M. Bluetongue: a historical and epidemiological perspective with the emphasis on South Africa. *Virology Journal*, v.9, n.1, p.198, 2012.

COSTA, J. R. R. Produção e padronização de antígeno para língua azul e prevalência nas mesorregiões sudoeste e sudeste do estado do Rio Grande do Sul, 1999. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

COUTO, S. E. R. Criação e manejo de coelhos. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002.

- DARPEL, K.; MONAGHAN, S. J.; TAKAMATSU, H. H. et al. Bluetongue virus in the mammalian host and the induced immune response. In: MELLOR, P.; BAYLIS, M.; MERTENS, P. **Bluetongue**. Paris: Elsevier, 2009. p. 265-282.
- DEMAULA, C. D.; JUTILA, M. A.; WILSON, D. W. et al. Infection kinetics, prostacyclin release and cytokine-mediated modulation of the mechanism of cell death during bluetongue virus infection of cultured ovine and bovine pulmonary artery and lung microvascular endothelial cells. *J. Gen. Virol.* v. 82, p. 787-794, 2001.
- DUARTE, J. M. B.; BRAGA, F. G.; VOGLIOTTI, A. et al. *Plano Nacional para a Conservação dos cervídeos ameaçados de extinção*. Brasília: Icmbio. 2012. 66 p.
- DUNGU, B.; POTGIETER, C.; VON TEICHMAN, B, et al. Vaccination in the control of bluetongue in endemic regions: the South African experience. *Dev Biol (Basel)*, v. 119, p. 463-472, 2004.
- EMIDIO, B. D.; NICOLUSSI, P.; PATTA, C. et al. Efficacy and safety on an inactivated vaccine against bluetongue virus serotype 2. *Vet Italiana*, v. 40, n. 4, p. 640-644, 2004.
- FAVERO, C. M.; MATOS, A. C. D.; CAMPOS, F. S. et al. Epizootic Hemorrhagic Disease in Brocket Deer, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 19, n. 2, p. 346-348, 2013.
- FERRARI, G.; DE LIBERATO, C.; SCAVIA, G. et al. Active circulation of bluetongue vaccine virus serotype-2 among unvaccinated cattle in central Italy. *Prev Vet Med*, v. 68, p. 103-113, 2005.
- GROOCOCK, C. M.; CAMPBELL, C. H. Isolation of an exotic serotype of bluetongue virus from imported cattle in quarantine. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, v. 46, p. 160-164, 1982.
- GUIMARÃES, L. L. B.; ROSA, J. C. C.; MATOS, A. C. D. et al. Identification of bluetongue virus serotype 1, 4, and 17 co-infections on sheep flocks during outbreaks in Brazil. *Res Vet Sci*, v. 113, p. 87-93, 2017.
- HAMERS, C.; GALLEAU, S.; CHERY, R. et al. Use of inactivated bluetongue virus serotype 8 vaccine against virulent challenge in sheep and cattle. *Veterinary records*, v. 165, n. 13, p. 369-373, 2009.
- HAMPSHIRE, V.; ROBERTSON, S. Using the facial grimace scale to evaluate rabbit wellness in post-procedural monitoring. *Lab Anim*, v. 44, p. 259-260, 2015.
- HILKE, J.; STROBEL, H.; WOELKE, S. et al. A comparison of different vaccination schemes used in sheep combining inactivated bluetongue vaccines against serotypes 4 and 8. *Vaccine*, n. 37, p. 5844-5853, 2019.
- HUNTER, P.; MODUMO, J. A monovalent attenuated serotype 2 bluetongue vaccine confers homologous protection in sheep. *Onderstepoort J. Vet. Res*, v.68, p.331-333, 2001.



ICTV International Committee on Taxonomy of viruses, Orbivirus. 2012. Disponível em:<<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>. Acessado em: 07 de nov. de 2019.

IUCN. Red List of Threatened Species. Version 2018. Disponível em:<[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acessado em: 07 de nov. de 2019.

KAWANAMI, A. E. *Vírus da língua azul em cervídeos neotropicais e bovídeos domésticos*. 2016. 99 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual, São Paulo, Jaboticabal.

KAWANAMI, A. E.; OLIVEIRA, J. P.; ARENALES, A. et al. Detection of bluetongue virus in Brazilian cervids in São Paulo state. *Pesq Vet Bras*, v. 38, p. 137-142, 2018.

KITANO, Y. Ibaraki disease in cattle. In: COETZER, J. A.; TUSTIN, R. C. **Infectious Disease of Livestock**. Cape Town: Oxford University Press, p.1221–1226, 2004.

LAGER, I. A. Bluetongue virus in South America: overview of viruses, vectors, surveillance and unique features. *Vet Ital*, v. 40, p. 89-93, 2004.

LOBÃO, F. M.; MELO, C. B.; MENDONÇA, C. E. D. et al. Língua Azul em ovinos: uma revisão. *Rev. Bras. Reprod. Animal*, v. 38, n. 2, p. 69-74, 2014.

LOBATO, Z. I. P. *Vírus da Língua Azul: construção de recombinantes em vírus vaccínia e resposta imune*. 1996, 200p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

LOBATO, Z. I. P.; COUPAR, E. H. B.; GRAY, C. P. et al. Antibody responses and protective immunity to recombinant vaccinia virus-expressed bluetongue virus antigen. *Vet Immunology and Immunopathology*, v. 59, p. 293-309, 1997.

LOBATO, Z. I. P.; GUEDES, M. I. M. C.; MATOS, A. C. D. Bluetongue and other orbiviruses in South America: gaps and challenges. *Vet. Ital.*, v.51, p. 253–262, 2015.

LORCA-ORÓ, C.; LOPEZ-OLVERA, J. R.; FERNÁNDEZ-SIRERA, L. et al. Evaluation of the efficacy of commercial vaccines against bluetongue virus serotypes 1 and 8 in experimentally infected red deer (*Cervus elaphus*). *Vet Microbiology*, v. 154, n. 3-4, p. 240-246, 2012.

MAAN, N. S.; MAAN, S.; POTGIETER A. C. et al. Development of Real-Time RT-PCR Assays for Detection and Typing of Epizootic Haemorrhagic Disease Virus. *Transb. Emerg. Dis.*, v. 64, n. 4 p. 1120-1132, 2016a.

MAAN, S.; MAAN, N. S.; BELAGANAHALLI, M. N. et al. Development and Evaluation of Real Time RT-PCR Assays for Detection and Typing of Bluetongue Virus. *Plos one*, v. 1, p. 1-19, 2016b.

MACEDO, L. B. *Desenvolvimento de novas formulações de vacinas contra o vírus da Língua Azul*. 2004, 76p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

MACLACHLAN, N. J.; GARD, G. Clinical signs and pathology. In: MELLOR, P.; BAYLIS, M.; MERTENS, P. **Bluetongue**. Paris: Elsevier, 2009. p. 197-212.

MACLACHLAN, N. J.; GUTHRIE, A. J. Re-emergence of bluetongue, African horse sickness, and other Orbivirus diseases. *Veterinary Research*, v. 41, n. 35, 2010.

MACLACHLAN, N. J.; MAYO, C. E.; DANIELS, P. W. et al. Bluetongue. *Sci. Tech*, v. 32, n. 2, p. 329-340, 2015.

MARTINELLE, L.; POZZO, F. D.; THYS, C. et al. Assessment of cross-protection induced by a bluetongue virus (BTV) serotype 8 vaccine towards other BTV serotypes in experimental conditions. *Veterinary Research*, v. 1, n. 49, p. 1-14, 2018.

MATOS, A. C. D.; GUEDES, M. I. M. C.; REHFELD, I. S. et al. Bovine vaccinia: Inactivated Vaccinia virus vaccine induces protection in murine model. *Vet Microbiology*, v. 204, p. 84-89, 2017.

MAYO, C. E.; OSBORNE, C. J.; MULLENS, B. A. et al. Seasonal Variation and Impact of Waste-Water Lagoons as Larval Habitat on the Population Dynamics of *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) at Two Dairy Farms in Northern California. *Plos one*, v. 9, n. 2, p. 1-9, 2014.

MCVEY, D. S.; MACLACHLAN, J. Vaccines for prevention of Bluetongue and Epizootic Hemorrhagic Disease in Livestock: A North American Perspective. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 15, n. 6, p. 385-396, 2015.

MECVEY, D. S.; MACLACHAN, N. J. Vaccines for Prevention of Bluetongue and Epizootic Hemorrhagic Disease in Livestock: A North American Perspective. *Vector borne zoonotic disease*, v. 15, n. 6, p. 385-396, 2015.

MERTENS, P.; ROSS-SMITH, N.; DIPROSE, J. et al. The structure of bluetongue virus core and proteins. In: MELLOR, P.; BAYLIS, M.; MERTENS, P. **Bluetongue**. Paris: Elsevier, 2009. p. 197-212.

MONTASSIER, H. J.; PANDOLFI, J. R.; ARAÚJO JR., J. P.; DUARTE, J. M. B. Língua Azul (LA) e Doença Hemorrágica Epizootica dos Cervídeos (DHEC) em cervos do Pantanal (*Blastocerus dichotomus*). Estudo sorológico e identificação viral. In: DUARTE, J. M. B. O Cervo-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) de Porto Primavera: resultado de dois anos de pesquisa. (CD-ROM). Jaboticabal: Funep, 2001.

OIE – World Organization for Animal Health. OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2020. Disponível em: <<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2017/>>. Acessado em: 07 jan. 2020.

OIE. Bluetongue. Terrestrial Animal Health Code. Paris, France. 25th Edition, 2018. Disponível em: <<http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-code/>>. Acessado em: 26 nov. 2018.

- ORRU, G.; FERRANDO, M. L.; MELONI, M. *et. al.* Rapid detection and quantitation of Bluetongue virus (BTV) using a Molecular Beacon fluorescent probe assay. *J. Virol. Meth.*, v. 137, n. 1, p. 34–42, 2006.
- OURA, C. A.; EDWARDS, L.; BATTEN, C. A. Evaluation of the humoral immune response in adult dairy cattle three years after vaccination with a bluetongue serotype 8 inactivated vaccine. *Vaccine*, v. 30, n. 2, p. 112-115, 2012.
- PANDOLFI, J. R. C. *Língua Azul e Doença Epizootica Hemorrágica dos cervídeos: investigação sorológica em ruminantes domésticos e silvestres*. 1999. 68 f. Dissertação (Mestrado em medicina veterinária – patologia veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal.
- PARKER, J.; HERNIMAN, K. A. J.; GIBBS, E. P. J. et al. An experimental inactivated vaccine against Bluetongue. *The veterinary record.*, v. 96, p. 284-287, 1975.
- PEARSON, J.; JOCHIM, M. Protocol for the immunodiffusion test for blue-tongue. *Proc. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn.*, v.22, p.463-471, 1979.
- PESSOA, C. A. Lagomorpha (Coelho, Lebre e Tapiti). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. *Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária*. 2. ed. São Paulo: Roca, 2014. 243p.
- PRASAD, S.; REDDY, N. Y.; SRINIVAS, K. et al. Safety and Immunogenicity of Bluetongue polyvalent vaccine in sheep and goat. *Journal of agriculture and veterinzary science*, v. 11, n. 3, p. 33-36, 2018.
- REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Epidemiol.*, v. 1, n. 27, p. 493–497, 1938.
- RIJN, P. A. V. Prospects of Next-Generation Vaccines for Bluetongue. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 6, p. 1-15, 2019.
- ROY, P. Bluetongue virus structure and assembly. *Curr Opin Virol*, v. 24, p. 115-123, 2017.
- RUDER, M. G.; LYSYK, T. J.; STALLKNECHT, L. D. et al. Transmission and Epidemiology of Bluetongue and Epizootic Hemorrhagic Disease in North America: Current Perspectives, Research Gaps, and Future Directions. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*, v. 15, n. 6, p. 348-363, 2015.
- RUSHTON, J.; LYONS, N. Economic impact of Bluetongue: a review of the effects on production. *Vet Italiana*, v. 51, n. 4, p. 401-406, 2016.
- SAVINI, G.; HAMERS, C.; CONTE, A. et al. Assessment of efficacy of a bivalent BTV-2 and BTV-4 inactivated vaccine by vaccination and challenge in cattle. *Vet Micro*, v. 133, p. 1-8, 2008.
- SAVINI, G.; LORUSSO, A.; PALADINI, C.; et al. Bluetongue serotype 2 and 9 modified live vaccine viruses as causative agents of abortion in livestock: a retrospective analysis in Italy. *Transbound Emerg Dis*, v. 61, n. 1, p. 69-74, 2014.

SAVINI, G.; RONCHI, G. F.; LEONE, A. et al. An inactivated vaccine for the control of bluetongue virus serotype 16 infection in sheep in Italy. *Vet Microbiology*, v. 124, n.1-2, p. 140-146, 2007.

SAVINI, G.; TITTARELLI, M.; BONFINI, B. et al. Serological response in cattle and sheep following infection or vaccination with bluetongue virus. *Vet Italiana*, v. 40, n. 4, p. 645-647, 2004.

SCHWARTZ-CORNIL, I.; MERTENS, P.C.; CONTRERAS, V. Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Vet. Res.*, v. 39, n. 46, p. 1-11, 2008.

SPEDICATO, M.; CARMINE, I.; TEODORI, L.; et al. Innocuity of a commercial live attenuated vaccine for epizootic hemorrhagic disease virus serotype 2 in late-term pregnant cows. *Vaccine*, v. 34, p. 1430-1435, 2016.

SPEISER, K. L.; SCHUMAKER, B. A.; COOK, W. E.; et al. Comparison of the humoral response between sheep vaccinated with a killed-virus vaccine and those vaccinated with a modified-live virus vaccine against bluetongue virus serotype 17. *J Am Med Vet Assoc*, v. 248, n. 9, p. 1043-1049, 2016.

SPICKLER, A. R.; ROTH, J. A. Adjuvants in veterinary vaccines: modes of action and adverse effects. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 17, n. 3, p. 273-281, 2003.

TIZARD, I. **Imunologia Veterinária**. 9ª edição. Editora Elsevier, 2014.

VITOUR, D.; GUILLOTIN, J.; SAILLEAU, C. et al. Colostral antibody induced interference of inactivated bluetongue serotype-8 vaccine in calves. *Veterinary Research*, v. 42, n. 1, p. 2-7, 2011.

WACKERLIN, R.; ESCHBAUMER, M.; KÖNIG, P. et al. Evaluation of humoral response and protective efficacy of three inactivated vaccines against bluetongue virus serotype 8 one year after vaccination of sheep and cattle. *Vaccine*, v. 28, n. 7, p. 4348-4355, 2010.

WILSON, W. C. et al. Current status of bluetongue virus in the Americas. In: MELLOR, P.; BAYLIS, M.; MERTENS, P. **Bluetongue**. Paris: Elsevier, 2009. p. 197-212.

WILSON, W. C.; DANIELS, P.; OSTLUND, E. N. et al. Diagnostic Tools for Bluetongue and Epizootic Hemorrhagic Disease Viruses Applicable to North American Veterinary Diagnosticians. *Vector borne zoonotic diseases*, v. 15, n. 6, 2015.

WISELY, S. M.; SAYLER, K. Autogenous vaccine field trial for epizootic hemorrhagic disease virus and bluetongue virus does not result in high titer to homologous virus serotypes. *Internet Journal of Infectious Disease*, v. 53 (suplemento), p. 149-150, 2016.

ZANOLARI, P.; BRUCKNER, L.; FRICKER, R. et al. Humoral Response to 2 Inactivated Bluetongue Virus Serotype-8 Vaccines in South American Camelids. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 24, p. 956-959, 2010.

ZHUGUNISSOVA, K.; BULATOVA, Y.; TARANOVA, D. et al. Beta-propiolactone inactivated bivalent bluetongue virus vaccine containing Montanide ISA-71VG adjuvant induces long-term immune response in sheep against serotypes 4 and 16 even after 3 years of controlled vaccine storage. *Veterinary Microbiology*, v. 226, p. 23-30, 2018.

ZIENTARA, S.; SANCHEZ-VIZCAINO, J. M. Control of bluetongue in Europe. *Vet Microbio*, v. 165, p. 33-37, 2013.

## ANEXO 1.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Desenvolvimento de vacinas inativadas contra o vírus da Língua Azul e da Doença Hemorrágica dos Cervídeos para imunização de cervídeos no Refúgio Biológico Bela Vista da ITAIPU Binacional.", protocolo do CEUA: 177/2018 sob a responsabilidade de Zelia Ines Portela Lobato que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 20/08/2018.

Vigência da Autorização	20/08/2018 a 19/08/2023
Finalidade	Pesquisa
<b>*Espécie/linhagem</b>	Coelho / Nova Zelândia
Nº de animais	5
Peso/Idade	1kg / 45(dias)
Sexo	feminino
Origem	Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa, UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Coelho / Nova Zelândia
Nº de animais	5
Peso/Idade	1kg / 45(dias)
Sexo	feminino
Origem	Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa, UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Coelho / Nova Zelândia
Nº de animais	5
Peso/Idade	1kg / 45(dias)
Sexo	feminino
Origem	Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa, UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Coelho / Nova Zelândia
Nº de animais	2
Peso/Idade	1kg / 45(dias)
Sexo	feminino
Origem	Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa, UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Coelho / Nova Zelândia
Nº de animais	2
Peso/Idade	1kg / 45(dias)
Sexo	feminino
Origem	Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa, UFMG

Considerações posteriores:

20/08/2018	Aprovado na reunião do dia 20/08/2018. Validade:
------------	--

20/08/2018 à 19/08/2023

Belo Horizonte, 21/03/2019.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)